

Funktionelle Analyse von konservierten nicht-codierenden Elementen mittels Zebrafisch als Modelorganismus

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie
der Beuth Hochschule für Technik Berlin

zur Erlangung des Akademischen Grades Bachelor of Science (B. Sc.)

vorgelegt von

Robert Martin

16. September 2010

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Robert Martin

Berlin, den 16.09.2010

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Hans Lehrach für die Möglichkeit der Durchführung meiner Bachelorarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Georgia Panopoulou für ihre hervorragende Betreuung während meiner Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Evolution & Development“, die mir stets tatkräftig zur Seite standen, allen voran Udo Georgi, dem ich so manche schlaflose Nacht bereitet habe.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Monika Gross für die Betreuung von Seiten der Hochschule bedanken.

Ich danke ebenfalls allen meinen Freunden, die viel Verständnis gezeigt haben, dass ich während der Bachelorarbeit zu wenig Zeit für sie gefunden habe.

Abschließend möchte ich auch meinen Eltern danken, ohne deren Hilfe und Unterstützung ich heute nicht da wäre wo ich bin.

Inhaltsverzeichnis

<u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u>	<u>I</u>
<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>II</u>
<u>INHALTSVERZEICHNIS.....</u>	<u>III</u>
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>V</u>
<u>TABELLENVERZEICHNIS.....</u>	<u>VII</u>
<u>ABSTRACT.....</u>	<u>IX</u>
<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>X</u>
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>XI</u>
<u>1 EINLEITUNG.....</u>	<u>1</u>
<u>1.1 cis-regulatorische Elemente.....</u>	<u>1</u>
<u>1.2 Funktionelle Analyse potentieller Enhancer-Elemente im Zebrafisch (Danio rerio).....</u>	<u>3</u>
<u>1.2.1 Co-Injektion von PCR-Produkten.....</u>	<u>4</u>
<u>1.3 Sonic Hedgehog.....</u>	<u>5</u>
<u>1.3.1 regulatorische Elemente um den shha-Locus.....</u>	<u>5</u>
<u>1.3.2 Struktur des 3'UTR von shha.....</u>	<u>6</u>
<u>1.4 Embryogenese des Zebrafisches.....</u>	<u>8</u>
<u>1.5 Zielsetzung der Arbeit.....</u>	<u>10</u>
<u>2 MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>11</u>
<u>2.1 Materialien.....</u>	<u>11</u>
<u>2.1.1 Chemikalien.....</u>	<u>11</u>
<u>2.1.2 Enzyme.....</u>	<u>11</u>
<u>2.1.3 DNA-Längenstandard.....</u>	<u>11</u>
<u>2.1.4 Geräte.....</u>	<u>12</u>
<u>2.1.5 Zubehör.....</u>	<u>12</u>
<u>2.1.6 Lösungen</u>	<u>12</u>
<u>2.1.7 Verwendete Oligonukleotide.....</u>	<u>12</u>
<u>2.2 Methoden.....</u>	<u>13</u>
<u>2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....</u>	<u>13</u>
<u>2.2.2 Elektrophoretische Trennung von Nucleinsäuren.....</u>	<u>14</u>

2.3 Der Zebrafisch - Entwicklungsbiologische Methoden.....	14
2.3.1 Haltung und Zucht der Zebrafische.....	15
2.3.2 Mikroinjektion in Zebrafischembryonen.....	15
2.3.2.1 Co-Injection Assay.....	17
2.3.3 Screening der injizierten Zebrafischembryonen.....	17
2.4 Bestimmung von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren.....	18
3 ERGEBNISSE.....	19
3.1 Mikroinjektion des konservierten nicht-codierenden Elements aus Maus (<i>Mus musculus</i>).....	19
3.2 Progressive Kürzung der homologen Sequenz aus dem 3'UTR des <i>shh</i> -Gens der Maus (<i>Mus musculus</i>).....	21
3.3 Mikroinjektion des konservierten nicht-codierenden Elements aus Huhn (<i>Gallus gallus</i>).....	23
3.4 Untersuchung der, mit Huhn- und gekürzten Maus-Fragmenten, co-injizierten Zebrafischembryonen 48 hpf.....	25
3.5 Mikroinjektion der konservierten nicht-codierenden Elemente aus Huhn (<i>Gallus gallus</i>) und Maus (<i>Mus musculus</i>) in Albino-Zebrafische.....	27
3.6 Identifikation potentieller Transkriptionsfaktorbindestellen innerhalb der Maus - Sequenz (<i>Mus musculus</i>).....	30
4 DISKUSSION.....	32
4.1 Das 248 bp große Maus-Fragment induziert EGFP-Expression in Muskelzellen 24 hpf.....	32
4.2 Das 248 bp große Maus-Fragment induziert EGFP-Expression in multiplen Gewebetypen 48 hpf.....	33
4.3 Co-Injektion des konservierten nicht-codierenden Elements aus Huhn (<i>Gallus gallus</i>)	34
5 LITERATURVERZEICHNIS.....	36
6 ANHANG.....	39
6.1 DNA-Sequenzen.....	39
6.1.1 Konserviertes 913 bp Fragment aus dem 3'UTR aus dem <i>shh</i> -Gen der Maus (<i>Mus musculus</i>).....	39
6.1.2 Konserviertes 1098 bp Fragment aus dem 3'UTR aus dem <i>shh</i> -Gen vom Huhn (<i>Gallus gallus</i>).....	39

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM DER TELEOSTEI (KNOCHENFISCHE).....	2
ABBILDUNG 2: ENHANCER-AKTIVITÄT DES ZF SHH.....	6
ABBILDUNG 3: KONSERVIERTER 3'UTR VON SHH IN TELEOSTEI UND MENSCH.....	7
ABBILDUNG 4: ZEBRAFISCHEMBRYONEN (24HPF) INJIZIERT MIT DEM KONSERVIERTEN 3'UTR VON SHHA.....	8
ABBILDUNG 5: AUSZUG AUS DER EMBRYONALENTWICKLUNG DES ZEBRAFISCHES.....	9
ABBILDUNG 6: INJEKTIONSPLATTE IN DRAUFSICHT UND QUERSCHNITT....	15
ABBILDUNG 7: DARSTELLUNG DES INJEKTIONSVORGANGES.....	16
ABBILDUNG 8: EXPRESSIONSMUSTER DES REGULATORISCHEN ELEMENTS AUS DEM 3'UTR DES SHH-GENS DER MAUS (M. MUSCULUS) IN ZEBRAFISCHEMBRYONEN.	20
ABBILDUNG 9: VERKÜRZTE FRAGMENTE DER MAUS_F/R-SEQUENZ, DIE MITTELS CO-INJEKTION GETESTET WURDEN.....	21
ABBILDUNG 10: EXPRESSIONSMUSTER DES MAUS_1/R-FRAGMENTS AUS DEM 3'UTR DES SHH-GENS DER MAUS (M. MUSCULUS) IN ZEBRAFISCHEMBRYONEN 24 HPF.....	22
ABBILDUNG 11: EXPRESSIONSMUSTER DES REGULATORISCHEN ELEMENTS AUS DEM 3'UTR DES SHH-GENS DES HUHNS (G. GALLUS) IN ZEBRAFISCHEMBRYONEN 24 HPF.....	23
ABBILDUNG 12: EXPRESSIONSMUSTER DES REGULATORISCHEN ELEMENTS AUS DEM 3'UTR DES SHH-GENS DES HUHNS (GALLUS GALLUS) IN ZEBRAFISCHEMBRYONEN 48 HPF.....	24
ABBILDUNG 13: EXPRESSIONSMUSTER DES EGFP IN ZEBRAFISCHEMBRYONEN 48 HPF NACH CO-INJEKTION DER CNE AUS MAUS (M. MUSCULUS) UND HUHN (G. GALLUS).....	26

**ABBILDUNG 14: VERTEILUNG DER EGFP-EXPRESSION INNERHALB
VERSCHIEDENER GEWEBE DER EGFP-POSITIVEN, NORMAL ENTWICKELTEN
ZEBRAFISCHEMBRYONEN 48 HPF.....27**

**ABBILDUNG 15: EXPRESSIONSMUSTER DES EGFP IN ALBINO-
ZEBRAFISCHEMBRYONEN 48 HPF NACH CO-INJEKTION DER CNE AUS MAUS
(M. MUSCULUS) UND HUHN (G. GALLUS).....29**

**ABBILDUNG 16: VERTEILUNG DER EGFP-EXPRESSION INNERHALB
VERSCHIEDENER GEWEBE DER EGFP-POSITIVEN, NORMAL ENTWICKELTEN
ALBINO-ZEBRAFISCHEMBRYONEN 48 HPF.....30**

**ABBILDUNG 17: IDENTIFIZIERTE BINDESTELLEN FÜR DEN
TRANSKRIPTIONSFAKTOR MEF2A INNERHALB DES MAUS_1/2 FRAGMENTS
.....31**

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE CHEMIKALIEN.....	11
TABELLE 2: VERWENDETE ENZYME.....	11
TABELLE 3: VERWENDETE DNA -LÄNGENSTANDARDS.....	11
TABELLE 4: VERWENDETE GERÄTE.....	12
TABELLE 5: VERWENDETES ZUBEHÖR.....	12
TABELLE 6: VERWENDETE LÖSUNGEN.....	12
TABELLE 7: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE UND IHRE SEQUENZEN.....	13
TABELLE 8: PROTOKOLL EINER STANDARD-PCR.....	13
TABELLE 9: STANDARD ANSATZ EINER PCR FÜR DIE AMPLIFIKATION VON DNA (GENOMISCH ODER PLASMID).....	14
TABELLE 10: EINSTELLWERTE DES MICROPIPETTE PULLERS ZUM AUSZIEHEN DER GLASKAPILLAREN.....	16
TABELLE 11: ANSATZ DER INJEKTIONS-LÖSUNG FÜR CO-INJEKTION.....	17
TABELLE 12: MIKROINJEKTION DES 913 BP GROSSEN CNE AUS DEM 3'UTR DES SHH-GENS DER MAUS (M. MUSCULUS).....	20
TABELLE 13: AUSWERTUNG ALLER MIKROINJEKTIONEN DES 913 BP GROSSEN MAUS_F/R-FRAGMENTS.....	21
TABELLE 14: MIKROINJEKTION DER PROGRESSIV GEKÜRZTEN FRAGMENTE AUS DEM 3'UTR DES SHH-GENS DER MAUS (M. MUSCULUS).....	22
TABELLE 15: MIKROINJEKTION DES 1098 BP GROSSEN CNE AUS DEM 3'UTR DES SHH-GENS DES HUHNS (G. GALLUS).....	23
TABELLE 16: MIKROINJEKTION DES 1098 BP GROSSEN CNE AUS DEM 3'UTR DES SHH-GENS DES HUHNS (G. GALLUS).....	24
TABELLE 17: MIKROINJEKTION DER CNE AUS DEM 3'UTR DES SHH-GENS AUS MAUS (M. MUSCULUS) UND HUHN (G. GALLUS).....	25

**TABELLE 18: MIKROINJEKTION DER CNE AUS DEM 3'UTR DES SHH-GENS
AUS MAUS (M. MUSCULUS) UND HUHN (G. GALLUS) IN ALBINO-
ZEBRAFISCHE.....28**

Abstract

The identification of candidate regulatory elements is based on the assumption that non-coding regions conserved across organisms are functionally important. Those elements can be identified via genomic sequence alignments and other computational methods.

During my bachelor's degree, I functionally analysed a region located in the 3'UTR of the Sonic Hedgehog (*Shh*) gene which is highly conserved among teleosts, but also in chicken (*Gallus gallus*), mouse (*Mus musculus*) and human (*Homo sapiens*).

It has been previously shown that the injection of the *Shh* 3'UTR conserved region from various teleosts in zebrafish (*Danio rerio*) directs EGFP expression in different tissues. To check whether the chicken and mouse *Shh* 3'UTR conserved regions also represent functional elements and to identify the tissue where they direct expression, I have injected them in zebrafish embryos using the *co-injection* approach.

I found that the conserved non-coding sequence from mouse induces an expression of EGFP in muscle tissue in 24hrs old zebrafish embryo. Through sequential injections of different parts of this region, I was able to show that a 248bp segment was responsible for this expression. Within this sequence I identified a binding site for the Mef2a transcription factor. This Mef2a site is most likely involved in inducing the EGFP expression in the muscle tissue. In addition, I have shown that the homologous elements from mouse and chicken induce EGFP expression in melanocytes and in the nervous system after 48hrs. So far no possible transcription factor binding site responsible for this expression pattern could be identified.

Zusammenfassung

Die Identifikation regulatorischer Elemente beruht auf der Annahme, dass nicht-codierende Sequenzabschnitte, die im Laufe der Evolution konserviert bleiben, eine *in vivo*-Funktion besitzen. Durch einen Sequenzvergleich nahe verwandter Arten können konservierte potentiell regulatorische Elemente vorhergesagt werden. Die Elemente können mit Hilfe der Co-Injektion in Zebrafischembryonen auf eine *in vivo*-Aktivität hin untersucht werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten konservierten, regulatorischen Sequenzabschnitte entstammen dem 3'UTR des *shh*-Gens aus Maus (*Mus musculus*) und Huhn (*Gallus gallus*). Diese Sequenz ist innerhalb der Teleostei stark konserviert und zeigt auch Konservierung in Huhn (*Gallus gallus*), Maus (*Mus musculus*) und Mensch (*Homo sapiens*). Es ist bereits bekannt, dass homologe Sequenzen aus den Teleostei bei Co-Injektionsexperimenten verschiedene EGFP-Expressionsmuster in Zebrafischembryonen induzieren.

Durch Co-Injektion sollten die Elemente der Maus und des Huhns auf *in vivo*-Aktivität in Zebrafischembryonen hin untersucht werden. Die progressive Verkürzung der Sequenzen sollte zur Identifikation möglicher Bindestellen für Transkriptionsfaktoren dienen.

In dieser Bachelorarbeit konnte gezeigt werden, dass die regulatorische Sequenz aus dem 3'UTR des *shh*-Gens der Maus bei Co-Injektion in Zebrafischembryonen eine EGFP-Expression in Muskelzellen 24 h alter Zebrafische induziert. Der regulatorische Bereich konnte dabei auf eine Region von 248 bp eingegrenzt werden. Es wurden Transkriptionsfaktorbindestellen für Mef2a identifiziert, die möglicherweise an der Expression von EGFP im Muskel beteiligt sind.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl das Element aus Maus, als auch das homologe Element aus Huhn, in 48 h alten Zebrafischembryonen eine Expression von EGFP in Melanocyten und im Nervensystem induzieren. Bisher konnte noch keine Transkriptionsfaktorbindestelle identifiziert werden, die verantwortlich für das Expressionsmuster von EGFP nach 48 h ist.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständige Bezeichnung
bp	Basenpaare (engl.: base pairs)
CNE	Konserviertes nicht-kodierendes Element (engl.: conserved non-coding element)
CNS	Konservierte nicht-kodierende Sequenz (engl.: conserved non-coding sequence)
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (engl.: enhanced green fluorescent protein)
hpf	Stunden nach der Befruchtung (engl.: hours post fertilization)
kb	Kilo-Basenpaare (engl.: kilo base pairs)
mya	1 Mio. Jahre (engl.: million years ago)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TFB	Transkriptionsfaktorbindestelle
UTR	untranslatierter Bereich (engl.: untranslated region)

1 Einleitung

1.1 *cis-regulatorische Elemente*

Die „genomische Ära“ wurde 1977 durch die Sequenzierung des Genoms des Bakteriophagen ϕ X174 (Sanger *et al.*, 1977) eingeleitet. Seitdem wurde eine enorme Anzahl an Genomen sequenziert. Durch den Vergleich der Genome verschiedener Spezies wurde klar, dass die Zunahme an Komplexität nicht mit der Zunahme an protein-codierenden Genen korreliert.

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* besitzt 20.000 protein-codierende Sequenzen, der Mensch besitzt ca. 20.000-25.000 (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Eine deutliche erhöhte Anzahl protein-codierender Sequenzen kann zwar nicht festgestellt werden, allerdings ist der Anteil an nicht codierenden Sequenzen des humanen Genoms dreißigfach größer als der von *C. elegans* (Martinez & Walhout, 2008). Offensichtlich entwickelten sich die komplexen Lebensformen hauptsächlich durch die zunehmende Komplexität der Genregulation (Levine & Tijan, 2003). Diese ist von essentieller Bedeutung für die Entwicklung und Differenzierung komplexer Organismen. Gene lassen sich vom regulatorischen Standpunkt aus in drei Gruppen einteilen.

Die erste Gruppe stellen die ubiquitären Haushaltsgene dar, die für wichtige Proteine des Energie- und des Stoffwechsels codieren. Die Promotoren dieser Gene verfügen meist nur über den Zustand aktiv oder inaktiv.

Die zweite Gruppe ist gekennzeichnet durch eine gewebespezifische Regulation. Neben den Promotoren besitzen diese auch eine geringe Anzahl an Transkriptionsfaktorbindestellen (TFB). Diese *cis-regulatorischen* DNA-Sequenzen ermöglichen durch die Bindung entsprechender Transkriptionsfaktoren (TF) eine orts- sowie umweltspezifische Expression (Jacob & Monod, 1961).

Die dritte Gruppe bezeichnet man als Entwicklungsgene. Die Expression dieser Gene ist abhängig von der Zeit, dem Ort und der Menge an Transkript. Sie verfügen über eine große Anzahl von *cis-regulatorischen* Sequenzen.

Diese zum Gen gehörenden DNA-Abschnitte können *upstream* und *downstream* der transkribierten Region, sowie zwischen den Exons lokalisiert sein. *Cis-regulatorische* Elemente können im Zusammenspiel mit TF die Aktivität der Gene entweder herabsetzen (Silencer) oder diese verstärken (Enhancer). Die Modifikation solcher *cis-regulatorischen* Elemente führt zu einer Änderung der Genaktivität. Dies scheint eine der wichtigsten Kräfte der Evolution und damit der morphologischen Diversität der Lebewesen zu sein (Ertzer *et al.*, 2006; Hinman & Davidson, 2007). Wenn diese *cis-regulatorischen* Elemente den gleichen

funktionellen und umweltbedingten Zwängen unterliegen wie protein-codierende Sequenzen, ist es wahrscheinlich, dass sie zu einem gewissen Grad konserviert bleiben (Nobrega & Pennacchio, 2004; Elgar & Vavouri, 2008). Der Vergleich von orthologen Genomabschnitten unterschiedlicher Spezies mittels Sequenzanalyse (Jones, 2006) führt zur Identifikation konservierter Genombereiche, die sowohl codierend als auch nicht-codierend sein können. In der Regel deuten Übereinstimmungen in der Sequenz phylogenetisch entfernt verwandter Spezies auf funktionelle Zwänge hin. Dadurch blieben im Laufe der Evolution auch Sequenzen erhalten die nicht codierend sind (engl.: conserved non-coding sequence, CNS). Durch natürliche Selektion liegen funktionelle regulatorische Bereiche bei verwandten Spezies konserviert vor. Unvorteilhafte Mutationen werden ausselektiert.

Ein entscheidendes Kriterium für Analysen hinsichtlich *cis*-regulatorischer Sequenzabschnitte ist die Auswahl der Taxa. Sind zwei Arten zu nah verwandt, kann die Orthologie der Sequenzen ihre konservierten funktionellen Elemente überdecken. Liegen die Arten phylogenetisch zu weit auseinander, sind Unterschiede in den konservierten nicht-codierenden Elementen (engl.: conserved non-coding element, CNE) zu groß um sie zu identifizieren (Boffelli *et al.*, 2004).

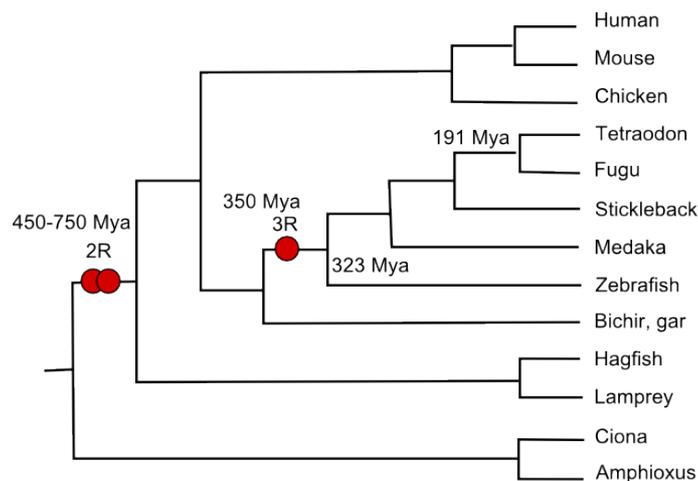


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Teleostei (Knochenfische).

Dargestellt ist das Verwandtschaftsverhältnis der *Teleostei* und ihr phylogenetischer Verwandtschaftsgrad innerhalb der Vertebraten [Menschen (Human), Maus (Mouse), Huhn (Chicken)], Seescheide (Ciona) und Lanzettfischen (Amphioxus)]. Rote Kreise kennzeichnen eine Genomduplikation. (Hermann, 2009)

Mittlerweile stehen für einen Sequenzvergleich zwischen unterschiedlichen Taxa zahlreiche Anwendungen, wie z. B. BLAST (Altschul *et al.*, 1990) oder LAGAN (Brudno *et al.*, 2003), zur Verfügung.

Hufton und Kollegen entwickelten eine neuartige sequenzvergleichende Methode zur Identifizierung von CNE (Hufton *et al.*, 2009). Verglichen wurden die Sequenzen von Säugetieren (*Mus musculus*), Fischen (*Danio rerio*), Mensch (*Homo sapiens*) und dem wirbellosen Chordat Amphioxus (*Branchiostoma floridae*). Amphioxus spaltete sich bereits vor ca. 650 Millionen Jahren vom Stammbaum der Vertebraten ab (Abbildung 1). Mit der

neuen Methode von A. Hufton konnten über 1000 CNE identifiziert werden. Bisher waren nur 70 konservierte nicht-codierende Elemente zwischen Amphioxus und den Vertebraten beschrieben (Holland *et al.*, 2008). 42 dieser konservierten nicht-codierenden Elemente wurden von der Arbeitsgruppe „Evolution and Development“ (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) mittels Co-Injektion auf ihre *in vivo* Enhancer-Aktivität untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass ein Rückschluss auf eine mögliche Enhancer-Aktivität mittels Co-Injektion möglich ist.

1.2 Funktionelle Analyse potentieller Enhancer-Elemente im Zebrafisch (*Danio rerio*)

Eine Möglichkeit potentielle Enhancer-Elemente *in vivo* zu testen stellen Injektionsexperimente dar. Als Modellorganismus wird dafür häufig der Zebrafisch (*Danio rerio*) verwendet. Der Zebrafisch zeichnet sich vor allem durch einfache Verfügbarkeit und externe Entwicklung der Embryonen aus. Die Embryonen sind transparent, wodurch sich die Vertebratenentwicklung von der Gastrulation bis zur Organogenese verfolgen lässt. Das Genom des Zebrafisches wurde bereits komplett sequenziert und es stehen eine Vielzahl von Mutanten zur Verfügung.

Es gibt grundsätzlich vier Methoden zum Testen von CNE auf *in vivo*-Aktivität: Transposon-basierte Methoden, retrovirale Vektoren, die Co-Injektion von PCR-Produkten und die Injektion von Fragmenten mit einer Meganuclease.

Mittels der Transposon-basierten Methode werden stabile Integrationen ins Genom erzeugt. Es gibt eine Vielzahl von bereits am Zebrafisch getesteten Transposons, unter anderem *Tc3*, *mariner*, *Sleeping Beauty*, *Ac/Ds* und *ToI2* (Mátes *et al.*, 2007). Dabei zeigte sich, dass das *Ac/Ds* Element und das *ToI2* Transposon mit 50 % die höchste Weitergabe von Integrationen über die Keimbahn besitzen. Beide Systeme können dabei bis zu 10 kb große Fragmente integrieren (Parinov & Emelyanov, 2007).

Das zweite System basiert auf einem retroviralen Vektor. Dieser besitzt mit über 80% die höchste Übertragung der Fremd-DNA in die Keimbahn. Diese Methode ist aber aufgrund des retroviralen Vektors am schwersten zu handhaben (Gaiano *et al.*, 1996).

Bei der Meganuclease-Methode wird das zu testende Konstrukt, bestehend aus der CNS, flankiert von *I-SceI* Schnittstellen, zusammen mit der *I-SceI* Meganuclease injiziert. Bei *I-SceI* handelt es sich um eine „Homing Endonuclease“ aus *Saccharomyces cerevisiae*. „Homing Endonucleasen“ besitzen, ähnlich wie Restriktionsendonucleasen, die Fähigkeit, unter Anwesenheit divalenter Metall-Ionen, spezifische Doppelstrangbrüche in DNA zu erzeugen. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Struktur, den Erkennungseigenschaften und ihrem genomischen Ursprung von diesen (Belfort & Roberts, 1997). Die „Homing Endonucleasen“ besitzen Erkennungssequenzen, die mit einer Länge von 12 - 40 bp sehr

spezifisch sind. Die Erkennungssequenz von *I-SceI* ist 18 bp lang (Grabher & Wittbrodt, 2007). Obwohl die Meganuclease die genomische DNA nicht schneidet, kommt es bei der Injektion einer Sequenz, die von *I-SceI* Erkennungssequenzen flankiert ist, zu einer Expression von EGFP. Der verantwortliche Mechanismus ist jedoch noch nicht völlig aufgeklärt. Beim Schneiden der DNA bleibt die Meganuclease an eines der entstehenden Enden gebunden (Belfort & Roberts, 1997). Man geht davon aus, dass dadurch der endogenen Ligase- und Replicase-Aktivität entgegengewirkt wird. Diese sind sonst für die starke Konkatemisierung herkömmlich injizierter DNA verantwortlich. Durch das Unterbinden der Konkatemisierung verbleiben mehr kurze Fragmente mit rekombinanten Enden in der Zelle (Grabher & Wittbrodt, 2007). Es wird vermutet, dass das Zellinterne Reparatursystem mit der Meganuclease interagiert. Die Reaktionspartner und Details des Mechanismus müssen jedoch noch weiter untersucht werden.

1.2.1 Co-Injektion von PCR-Produkten

Bei der Co-Injektion handelt es sich um eine schnelle und einfache Technik zur Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente (Müller *et al.*, 1997). Es werden zwei PCR-Produkte in das 1-4-Zellstadium der Embryonen co-injiziert. Ein PCR-Produkt enthält die zu testende konservierte nicht-codierende Sequenz (CNS). Das zweite PCR-Produkt trägt einen Minimalpromotor mit nachgeschaltetem Reporter gen. Das Reporter gen befindet sich unter der Kontrolle des Minimal-Promotors. Zum Beispiel kann das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) als Reporter gen eingesetzt werden. Das grün fluoreszierende Protein der Qualle *Aequoria victoria* dient der Visualisierung der Genaktivität *in vivo*. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von *lacZ* als Reporter gen, welches für das Enzym β -Galactosidase codiert.

Der molekulare Mechanismus der Co-Injektionsmethode ist noch nicht vollständig verstanden. Es gibt zwei Wege diesen zu erklären. Zum einen könnten die Enhancer ihren Effekt übertragen, wenn sie durch eine Proteinbindung an den Promotor binden. Diese Bindung ist nicht kovalent (Müller *et al.*, 1997). Zum anderen ist bekannt, dass es im Fisch schnell und effizient zur Bildung von extrachromosomalen Konkatemenen von Fremd-DNA kommt (Winkler *et al.*, 1991). Dabei lagern sich offensichtlich die injizierten Moleküle aneinander und bilden wiederholende Sequenzen. Daraus resultiert die „Kopf-an-Kopf-“ sowie die „Kopf-an-Schwanz-Orientierung“ von DNA-Elementen, die relativ unabhängig von den DNA-Enden auftritt. Durch DNA-Looping kann es dann zu einer *cis*-Aktivierung des Promotors kommen (Müller *et al.*, 1997).

Ein Nachteil der Co-Injektionsmethode besteht darin, dass es nur selten zu einer Integration ins Genom kommt und die EGFP-Expression transient bleibt. Während der

Furchungsteilungen wird die Injektionslösung unterschiedlich auf die Blastomere verteilt, woraus eine Mosaikexpression resultiert. Aus diesem Grund bedarf es einer Vielzahl an injizierten Zebrafischembryonen um eine aussagekräftige Expressionskarte zu erstellen.

1.3 Sonic Hedgehog

Bei Sonic hedgehog (*shh*) handelt es sich um ein sekretierendes, intrazelluläres Signalmolekül, das zur Hedgehog-Familie gehört. Es ist von entscheidender Bedeutung während der Embryonalentwicklung von Vertebraten. Zum einen ist es an der Differenzierung von Neuronen und zum anderen an der Ausbildung der Chorda dorsalis beteiligt. Zudem ist es in eine Vielzahl weiterer Differenzierungsprozesse involviert; wie die antero-posteriore Spezifizierung der Extremitäten, die Musterbildung der Somiten und die Etablierung der Asymmetrie entlang der links-rechts-Achse (Chang *et al.*, 1997). Die Expression von *Shh* zeigt sich in Vertebraten vor allem in Regionen, die eine organisatorische Funktion besitzen.

Neben *shh* sind noch zwei weitere Hedgehog-Gene in Vertebraten bekannt. Man geht davon aus, dass Sonic hedgehog, Desert hedgehog (*dhh*) und Indian hedgehog (*ihh*) durch zwei Duplikationen und anschließender Divergenz von einem Urgen entstanden sind (Zardoya *et al.*, 1996). Am Ursprung der Teleostei (Knochenfische) gab es eine weitere Duplikation, wodurch die meisten Teleostei zwei *shh*-Gene besitzen (*shha* und *shhb*) (Hoegg *et al.*, 2004; Panopoulou & Poustka, 2005). *Shha* entspricht dabei dem *shh* der Mammalia. *Shhb* unterscheidet sich geringfügig von *Shha*. Es zeigt eine ähnliche Proteinaktivität, wird jedoch nur in der Bodenplatte exprimiert (Hadzhiev *et al.*, 2007).

1.3.1 regulatorische Elemente um den *shha*-Locus

Durch die Analyse des *Shh*-Promotors in HeLa-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass für die *trans*-Aktivierung zwei Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Axial (*Axl*) erforderlich sind. *Axl* (in *Mammalia* *HNF3β*) scheint ein direkter Regulator des *shh*-Gens zu sein. Ferner wurde ein Retinsäure-responsives Element (RARE) im *shh*-Promotor identifiziert. Sowohl *Axl* als auch Retinsäure-Rezeptoren (RARs) zeigten in HeLa-Zellen eine Regulierung des *shh*-Promotors (Chang *et al.*, 1997).

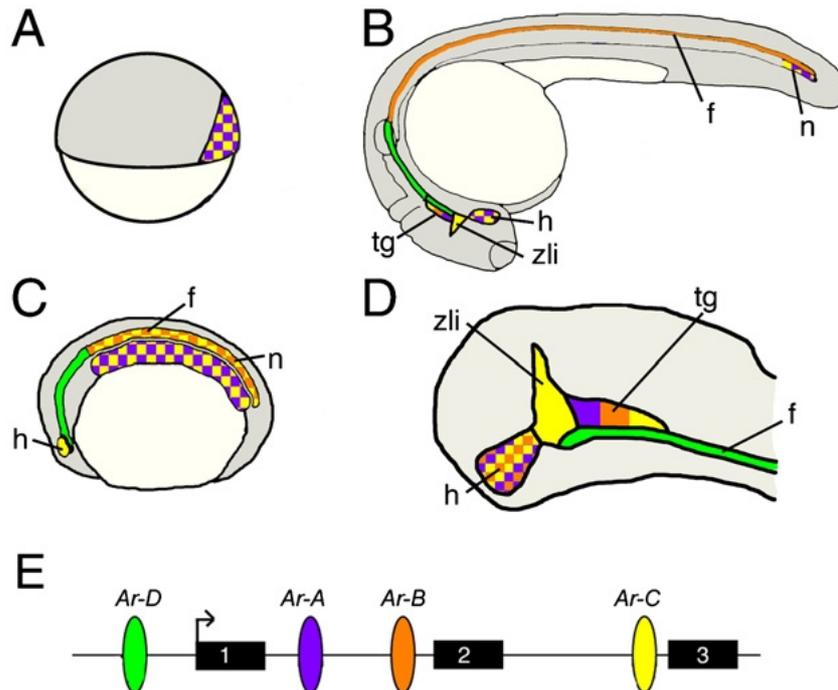


Abbildung 2: Enhancer-Aktivität des Zf *Shh*.

A) embryonic shield **B)** 3-Somiten-Stadium **C)** 24 h alter Embryo **D)** 32 h altes Gehirn **E)** zeigt die Enhancerregionen Ar-A, Ar-B, Ar-C und Ar-D um das *Shh* Gen bestehend aus 3 Exons (schwarze Rechtecke). Der Pfeil zeigt den Transkriptionsstart. Die Orte der jeweiligen Expression sind in denselben Farben dargestellt wie die Enhancer. Abkürzungen: f: floor plate, h: hypothalamus, n: chorda, tg: tegmentum, zli: zona limitans intrathalamica (Ertzer *et al.*, 2007).

Für die *shha*-Expression im Zebrafisch ist der Promotor alleine allerdings nicht ausreichend. Bisher sind vier weitere Enhancer-Elemente bekannt (Ar-A, Ar-B, Ar-C und Ar-D), die benötigt werden um das richtige Expressionsmuster zu erzeugen (Abbildung 2). Ar-A, Ar-B und Ar-C gehören dabei zu den konservierten nicht kodierenden Elementen (Woolfe *et al.*, 2005).

1.3.2 Struktur des 3'UTR von *shha*

Der 3'UTR (untranslatierte Region) von *shh* ist innerhalb der Teleostei stark konserviert, mit einer Übereinstimmung von über 80 % zwischen Zebrafisch (*Danio rerio*), Kugelfisch (*Takifugu rubripes*), Medaka (*Oryzias latipes*) und Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Ein kleiner Bereich der Sequenz zeigt sogar eine stärkere Konservierung (>90 %). Dieser Bereich ist noch zu mehr als 80 % im humanen Genom konserviert.

Mittels rVISTA 2.0 (<http://rvista.dcode.org>) und des nicht publizierten „Transcription Factor Affinity Prediction Web Tool“ (Dr. A. Hufton, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik) wurden innerhalb dieses Bereiches Bindestellen für drei Transkriptionsfaktoren vorhergesagt (Pax1, CDX, LXR) (Abbildung 3).

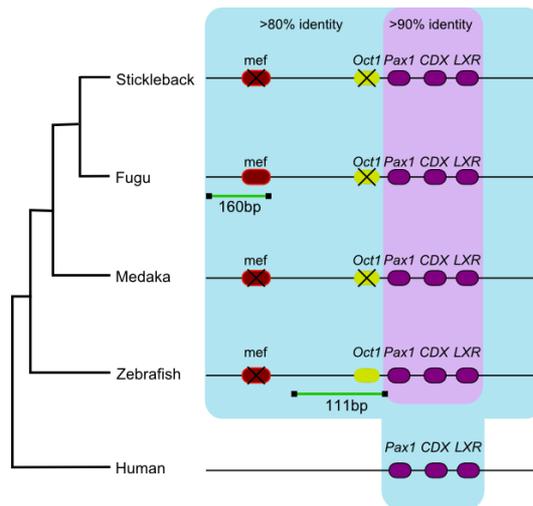


Abbildung 3: konservierter 3'UTR von *shh* in Teleostei und Mensch

Der blaue Bereich zeigt >80% Identität der Sequenz, der violette Bereich 90% Identität.

Zebrafisch: 111 bp sind ausreichend um Expression in der Chorda zu induzieren.

Fugu: 160 bp sind ausreichend um Expression im Muskel zu induzieren.

Degenerierte Motive sind durch ein Kreuz markiert (Georgi *et al.*, 2010)

Die *in vivo* Analyse kann durch die Co-Injektion des konservierten 3'UTR des *shh* Gens in Zebrafischembryonen durchgeführt werden. Woolfe und Kollegen (2005) zeigten bereits, dass die Sequenz aus Kugelfisch in Co-Injektions-Experimenten eine Expression hauptsächlich in der Muskulatur induziert. Trotz der hohen Ähnlichkeit der Sequenz innerhalb der Teleostei, zeigen homologe Sequenzen der verschiedenen Spezies unterschiedliche *in vivo*-Aktivität im Zebrafisch. Die homologe Zebrafisch-Sequenz induziert eine EGFP-Expression in der Chorda dorsalis.

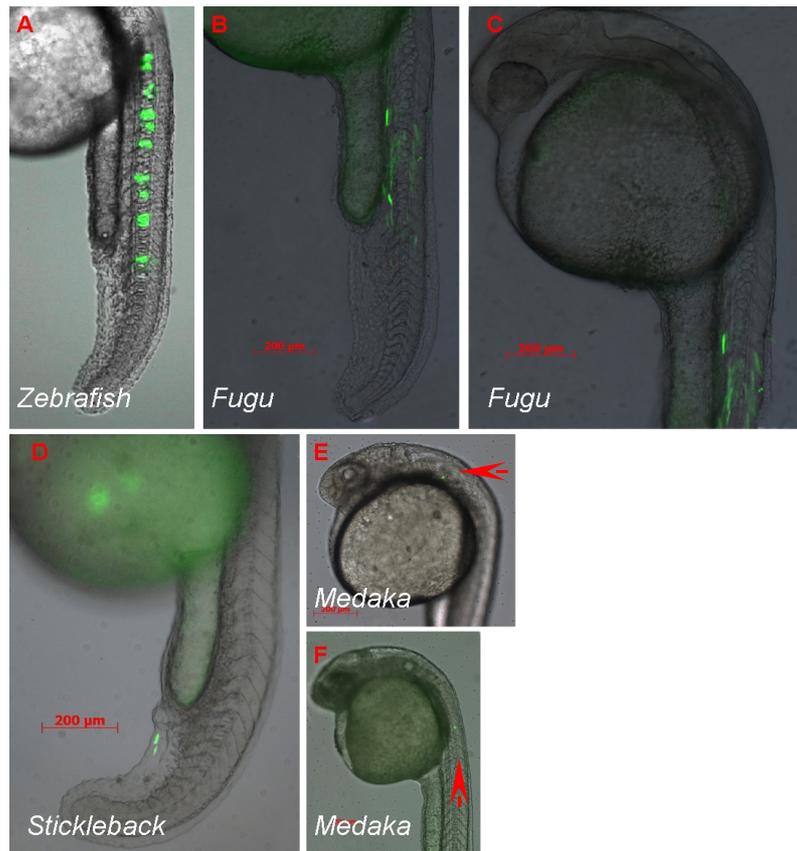


Abbildung 4: Zebrafischembryonen (24hpf) injiziert mit dem konservierten 3'UTR von *shha*
A) aus Zebrafisch: zeigt GFP-Expression in der Chorda dorsalis. **B,C)** aus Kugelfisch: zeigt GFP-Expression im Muskel. **D)** aus Stickleback: zeigt GFP-Expression ventral der Schwanzflosse. **E,F)** aus Medaka: zeigt GFP-Expression nahe der Ohranlage (otic vesicle) und dem Hinterhirn (Hermann, 2009)

Die Arbeitsgruppe Poustka/Panopoulou (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik) konnte mittels Co-Injektion nachweisen, dass die homologe Sequenz aus Stickleback eine spezifische EGFP-Expression ventral der Schwanzflosse induziert. Die Medaka-Sequenz zeigt hingegen eine Expression nahe der Ohranlage (Hermann, 2009) (Abbildung 4).

1.4 Embryogenese des Zebrafisches

Die Oozyten des Zebrafisches sind telolecithal, d.h. der Dotter ist am vegetativen Pol konzentriert. Die Furchungsteilungen finden aus diesem Grund nur am animalen Pol der Eizelle, welche ca. 700 µm groß ist, statt. Dort bildet sich nach der Befruchtung die Keimscheibe auf dem Dotter aus. Dieser Furchungstyp wird als diskoidal bezeichnet. Circa 40 min nach der Befruchtung erfolgt die erste Zellteilung (Abbildung 5 B). Im Abstand von 15 min erfolgen weitere synchrone Zellteilungen bis zum Erreichen des 128 Zellstadiums (2¼ hpf; engl.: hours post fertilization). Die folgenden Zellteilungen verlaufen asynchron.

Dies stellt den Übergang zum Blastulastadium dar. Der Zebrafischembryo wächst nun als Keimstreifen in Richtung des vegetativen Pols um den Dotter, bis sich ein Keimring ausgebildet hat (Epibolie). Nachdem die Blastodermzellen die Hälfte des Dotters umhüllt haben (50% Epibolie, Abbildung 5 E), beginnt die Gastrulation. Dabei wandern die Zellen in Richtung des Keimstreifens. Mit der Ausbildung des Keimrings geht der Embryo in die Segmentationsphase über. In dieser Phase bilden sich die Somiten aus, wodurch auch die Chorda dorsalis entsteht. Sind 22 Stunden nach der Befruchtung 26 Somiten ausgebildet, werden die Stadien der Embryonalentwicklung anhand der Wanderung des Primordiums angegeben (Pharyngula Periode). Bereits 24 hpf sind alle Organanlagen des Embryos ausdifferenziert (Abbildung 5 K). Zu diesem Zeitpunkt sind das schlagende Herz, sowie der Blutstrom im Gefäßsystem sichtbar. Außerdem beginnen Leber und Niere des Fisches zu arbeiten. Der Zebrafisch ist nun außerhalb seines Chorions lebensfähig.

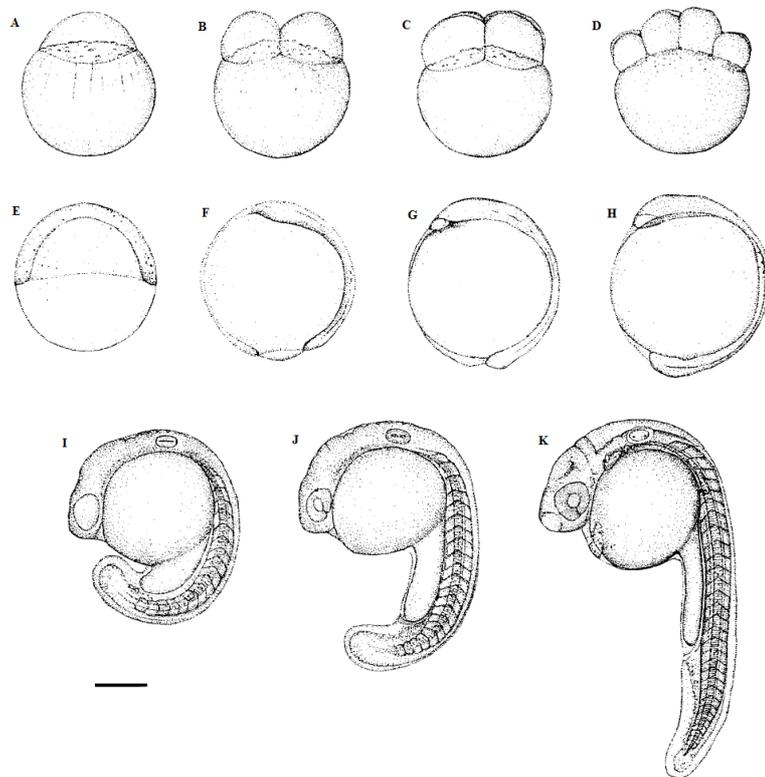


Abbildung 5: Auszug aus der Embryonalentwicklung des Zebrafisches

Darstellung verschiedener Stadien der Embryogenese des Zebrafisches. Frontansicht mit animaler Seite oben (A-E), bzw. Ansicht auf die linke Seite mit anteriorer Seite oben (F-K). A) 1-Zellstadium, B) 2-Zellstadium nach 45 Minuten, C) 4-Zellstadium nach einer Stunde, D) 8-Zellstadium nach 1,25 Stunden, E) 50%ige Epibolie nach 5,3 Stunden, F) 90%ige Epibolie nach 9 Stunden, G) bud-Stadium nach 10 Stunden, H) 3-Somiten-Stadium nach 11 Stunden, I) 18-Somiten-Stadium nach 18 Stunden, J) 21-Somiten-Stadium nach 19,5 Stunden, K) prim-6-Stadium nach 24 Stunden, Maßstab: 250 µm (Kimmel *et al.*, 1995).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Bachelorarbeit ist es konservierte Elemente aus der Maus (*M. musculus*) und aus dem Huhn (*G. gallus*) auf ihre regulatorische Funktion hin zu untersuchen. Es handelt sich bei den konservierten Elementen um homologe Sequenzen aus dem 3'UTR des *shh*-Gens. Das untersuchte DNA Fragment aus der Maus ist 913 bp und das des Huhns 1098 bp groß. Die Sequenz aus dem 3'UTR des *shh*-Gens ist zwischen den Teleostei (hier *shha*) stark konserviert und zeigt ebenfalls Konservierung zu Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*M. musculus*) und Huhn (*G. gallus*). Es wurde bereits gezeigt, dass die homologen Sequenzen von Zebrafisch (*D. rerio*), Kugelfisch (*T. rubripes*), Medaka (*O. latipes*) und Stickleback (*G. aculeatus*) regulatorische *in vivo*-Aktivität besitzen. Trotz der starken Konservierung fallen die Ergebnisse von Co-Injektionsexperimenten je nach Organismus anders aus. Die homologe CNS des Kugelfisches induziert in Zebrafischembryonen eine EGFP-Expression in Muskelzellen (Woolfe *et al.*, 2005). Die CNS aus Zebrafisch induziert hingegen eine EGFP-Expression in der Chorda dorsalis (Braun, 2009, Georgi, 2009). Weiterhin konnte Hermann (2009) zeigen, dass die CNS aus Medaka primär eine EGFP-Expression in der Ohranlage und die CNS aus Stickleback primär eine Expression von EGFP in der ventralen Schwanzflossenregion induziert.

Die homologen Sequenzen aus Maus und Huhn sollen bezüglich einer potentiellen *in vivo*-Aktivität charakterisiert werden. Durch die Co-Injektion dieser CNS soll eine spezifische Expression von EGFP nachgewiesen werden. Um die regulatorische Sequenz weiter einzugrenzen, werden die CNS progressiv verkürzt und erneut injiziert. Anschließend sollen potentielle TFB mit Hilfe eines experimentellen Algorithmus vorhergesagt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
Agarose	Invitrogen	#15510-019
Betaine	Sigma	#B2629
Bromphenolblau	Merck	#1.08122.0025
dNTPs	Pharmacia	#27-2035
Ethidiumbromid	Sigma	#E1510
Methylenblau	Merck	#1.15943.0025
Phenolrot	Sigma	#P0290-100ML
Tricaine	Sigma	#A5040-5G

2.1.2 Enzyme

Tabelle 2: Verwendete Enzyme

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
Pronase E	Sigma	#P69111G
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Stratagene	#600131/ #B0101S
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Stratagene	#600135

2.1.3 DNA-Längenstandard

Tabelle 3: Verwendete DNA -Längenstandards

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
100 bp DNA ladder	New England Biolabs	#N3231S
1 kb DNA ladder	Stratagene	#201115

2.1.4 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Name	Hersteller
Binocular Leica MZ8	Leica
Brutschrank BK700	Heraeus
Elektrophorese-Kammer	Stratagene
Microinjektor FemtoJet	Eppendorf
Micropipette Puller P-97	Sutter Instruments
Mikroskop LSM510	Zeiss
Mikroskop invers mit Injektor	Leica
UV-Illuminator	Alpha Innotech

2.1.5 Zubehör

Alle Plastikwaren wurden von Corning und Greiner bezogen.

Tabelle 5: Verwendetes Zubehör

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
Microloade Pipettenspitzen 20µL	Eppendorf	#5242 956.003
Glaskapillare mit Filament	Sutter Instruments	#BF100-78-10

2.1.6 Lösungen

Tabelle 6: Verwendete Lösungen

Lösung	Konzentrationen der verwendeten Chemikalien
Gelladepuffer	4 mM TRIS-Acetat (pH 8.0), 0,2 mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau (w/v), 50% Glycerin (v/v)
PCR-Puffer(10x)	350 mM TRIS-Acetat (pH 9.0), 150 mM TRIS-HCl (pH 9.0), 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 1% Tween20 (v/v)
TAE-Puffer	40 mM TRIS-Acetat (pH 7.5), 1 mM EDTA
60x E3 Puffer	5M NaCl, 250mM KCl, 0,5M CaCl ₂ , 1M MgSO ₄

2.1.7 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide und ihre Sequenzen

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
1	F_HMRC_Sh6	AAGTAGGACAGTCCAAAGTAGACT
2	R_Mouse_shh6	GCAACAGGAATTCTCAGAAAATATCTAC
3	F_Mouse_shh6_1	TGTGAACTGTA CTACACAGTGA
4	R_Mouse_shh6_2	AATGTCATT CAGTTAGGTATTGATC
5	F_Mouse_shh6_3	TAAAAGTGCACCTAGCAGCGA
6	R_Chicken_shh6	GCACCAGGAACTCTTAGTTATTATATAC
7	β -Globin-EGFP_F	GGAAGGCCATCCAGCCTC
8	β -Globin-EGFP_R	GTGCCACCTGACGTCTAAG

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion ist es möglich spezifische DNA-Abschnitte, sowohl von genomischer DNA, als auch von Plasmid-DNA, zu amplifizieren. Das Protokoll für eine Standard-PCR ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Protokoll einer Standard-PCR

Zyklenzahl	Temperatur in °C	Zeit in sekunden	Schritt
	94°C	120 s	
30 x/ 40 x	94°C	30 s	Denaturierung
	50°C	30 s	Annealing
	55°C	120 s	Elongation
	55°C	300 s	
	15°C	∞	

Für die Amplifikation genomischer DNA wurden 100 ng DNA eingesetzt. Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurde von 1 ng/ μ l Plasmid eingesetzt (Tabelle 9). Die Primer sowie die dNTPs wurden in einer Endkonzentration von 0,2 pmol/ μ L eingesetzt. Die Anzahl der PCR-Zyklen betrug 40 Wiederholungen. Für die Erhöhung der Konzentration der PCR-Produkte wurde der Ansatz mit Betain versetzt.

Tabelle 9: Standard Ansatz einer PCR für die Amplifikation von DNA (genomisch oder Plasmid)

Mögliche Zusätze: Betain

Komponente		Finale Konzentration	Volumen pro Probe
10x PCR-Puffer		1x	5 µL
dNTPs (10 mM)		0,2 mM	1 µL
<i>Taq</i> -DNA Polymerase (10 U/ µL)		0,2 U	1 µL
Forward Primer (10 pmol/ µL)		0,2 pmol/ µL	1 µL
Revers Primer (10 pmol/ µL)		0,2 pmol/ µL	1 µL
mögl. Zusätze:	Betain (5 M)	0,1 M	15 µL
template:	genom. DNA	100 ng	x
	Plasmid-DNA	1 ng	x
ddH ₂ O			auf 50 µL auffüllen
Gesamtvolumen			50 µL

2.2.2 Elektrophoretische Trennung von Nucleinsäuren

Für die elektrophoretische Trennung von Nucleinsäuren wurden Horizontalgelkammern (Stratagene) verwendet. Die Gele hatten standardmäßig eine Agarosekonzentration von 1%. Dafür wurden 0,7 g Agarose mit 70 mL 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgeköcht und vor dem Erstarren mit 2 µL Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurden 5 µL PCR-Produkt mit 1 µL 6x Ladepuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Bei einer Spannung von 100 V wurden die Proben 20 min nach ihrer Größe aufgetrennt. Bei jeder Gelelektrophorese wurde neben den Proben ein DNA-Längenstandard aufgetragen. Die Visualisierung und Dokumentation der Nucleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines UV-Illuminators (Alpha Innotech). Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch den Vergleich mit dem DNA-Längenstandard bestimmt.

2.3 Der Zebrafisch - Entwicklungsbiologische Methoden

2.3.1 Haltung und Zucht der Zebrafische

Die für die Experimente verwendeten Zebrafische (Stamm: AB) wurden in einem geschlossenen Aquariensystem gehalten (Wassertemperatur 27°C). In einem Tank (600 mm x 150 mm x 400 mm) der Aquarienanlage befanden sich circa 30 Tiere. Das Futter der Zebrafische bestand aus handelsüblichen Trockenfutter, sowie frisch geschlüpften salinen Krebsen (*Artemia salina*). Die Aufzucht und die Eiablage der Zebrafische geschah in Anlehnung an die Angaben in „The Zebrafisch Book“ (Westerfield, M., 2000). Zum Abläichen der Zebrafische wurden diese paarweise 18 h vor der Paarung in separate Aquarien (250 mm x 100 mm x 70 mm) überführt (12 Ansätze). Männchen und Weibchen waren dabei durch einen Einsatz mit Bodengitter voneinander getrennt. Außerdem wurden in jedes Becken zwei Streifen grüner Filterwatte gelegt. Dies diente als Seegrassersatz und ist für die Eiablage essentiell. Am nächsten Tag wurde das Männchen zum Weibchen gesetzt. Nach circa 30 min wurden die befruchteten Eier entnommen. Dazu wurde der Inhalt der separaten Aquarien über ein Sieb abgossen. Die Eier wurden im Anschluss mit Fischwasser gewaschen und in 1x E3-Puffer überführt. Die Zebrafischembryonen der 10-12 Verpaarungen je Zeitpunkt wurden anschließend vereinigt.

2.3.2 Mikroinjektion in Zebrafischembryonen

Für die Injektionsplatten wurden Petrischalen (90 mm) im ersten Schritt 3 mm hoch mit 1 % Agarose E3-Puffer befüllt. Nach dem Erstarren der Agarose wurde eine zweite Schicht Agarose 3 mm aufgegossen. In die noch flüssige Agarose wurde eine Schablone mit dreieckspyramidenförmigen Erhebungen (Höhe ca. 1,8 mm) eingesetzt (Abbildung 6).

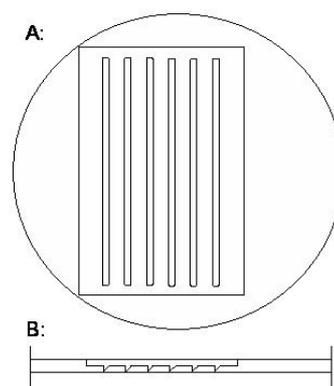


Abbildung 6: Injektionsplatte in Draufsicht und Querschnitt

A) Draufsicht

B) Querschnitt durch eine Injektionsschale

Für die Mikroinjektion wurden die Zebrafischembryonen auf die Injektionsplatte aufgebracht und mit Hilfe einer schräg abgeschnittenen 0,5 mL Einwegpasteurpipette in den

dreieckspyramidenförmigen Vertiefungen platziert. Unter Verwendung eines Binokulars (Leica) wurden die Zebrafischembryonen so ausgerichtet, dass die Zelle zum senkrechten Rand der Vertiefung zeigte.

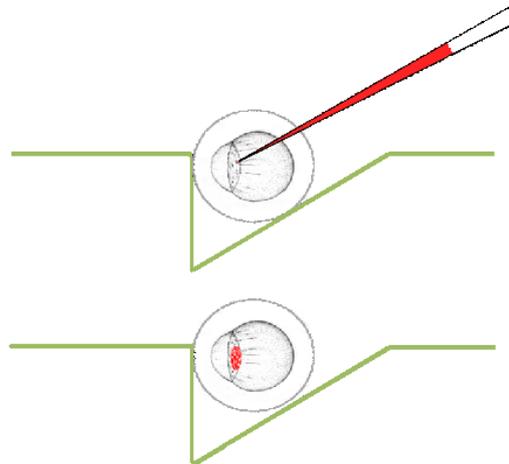


Abbildung 7: Darstellung des Injektionsvorganges

Oben: Die Injektionsnadel wird durch das Chorion und durch den Dotter in das Einzellstadium des Zebrafischembryonen geführt.

Unten: Der Zebrafischembryo nach der Injektion. Die applizierte Injektionslösung ist durch den roten Punkt gekennzeichnet

Der Injektionsvorgang wurde an einem inversen Mikroskop (Leica) durchgeführt. Die verwendeten Glaskapillaren (Außendurchmesser: 1 mm, Innendurchmesser: 0,78 mm, Schutter Instruments). wurden mittels eines Micropipette Puller (Schutter Instruments) ausgezogen (Tabelle 10).

Die Glaskapillare wurde mit der Injektionslösung unter Verwendung einer Microload Pipettenspitze (Eppendorf) befüllt. Die zugeschmolzene Kapillarspitze wurde mit Hilfe eines Skalpell geöffnet. Mittels des Mikromanipulators (Leica) wurde die Glaskapillare durch den Dotter von hinten in das 1-4-Zellstadium des Zebrafischembryos geführt und die Injektionslösung appliziert (Abbildung 7). Die Einstellung der Menge der Injektionslösung erfolgte mittels Druck und Zeiteinstellung am FemtoJet (Eppendorf) auf 1/10 der Zelle. Nach der Injektion wurden die Zebrafischembryonen mit 1x E3-Puffer von der Injektionsplatte in eine Petrischale 90 mm gespült. Die Petrischale wurde mit 1x E3-Puffer aufgefüllt und über Nacht bei 27°C inkubiert (Lin, 2000).

Tabelle 10: Einstellwerte des Micropipette Pullers zum Ausziehen der Glaskapillaren

Komponente	Einstellung
Heat	550
Pull	80
Velocity	120
Time	120

Für jede Probe wurden 3 Injektionsplatten mit ca. 175 Embryonen injiziert, so dass die Gesamtanzahl 525 Embryonen betrug. Zusätzlich wurde noch eine vierte Injektionsplatte mit 175 Embryonen mit einer bereits etablierten Positivkontrolle injiziert und eine Injektionsplatte nicht injizierte Embryonen als Negativkontrolle erstellt.

2.3.2.1 Co-Injection Assay

Beim „Co-injection Assay“ werden die zu untersuchende CNS und ein Reporterkonstrukt als separate PCR-Produkte in die Embryonen injiziert (Müller *et al.*, 1999). Das Reporterkonstrukt bestand aus EGFP, das sich unter direkter Kontrolle von dem minimalen, humanen β -Globin-Promotor befand. Diese Konstrukt wurde mittels PCR vom β -Globin/EGFP Vektor (Dr. G. Elgar (Center for Genomic Research, Cambridge)) amplifiziert. Die Zusammensetzung der Injektionslösung ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Ansatz der Injektionslösung für Co-Injektion

*abhängig von der Konzentration der PCR-Produkte

Komponente	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
Phenolrot (100 %)	10 %	1 μ L
β -Globin/EGFP PCR-Produkt (Reporterkonstrukt)	250 ng	0,4-8 μ L *
aufgereinigtes PCR-Produkt (regulatorische DNA)	1000 ng	0,4-8 μ L *
ddH ₂ O		0-7 μ L *
Gesamtvolumen pro Ansatz		10 μ L

Für die Injektion wurden immer 25 ng/ μ L PCR-Produkt des β -globin-EGFP-Reportergens und 100 ng/ μ L CNS verwendet. Die Injektionslösung wurde direkt in das 1-4-Zellstadium des Embryos injiziert. Die Menge und Position der Injektionslösung wurde dabei über das Phenolrot bestimmt.

2.3.3 Screening der injizierten Zebrafischembryonen

Am Tag nach der Injektion wurden die abgestorbenen Zebrafischembryonen mit einer Einwegpasteurpipette entfernt. Die überlebenden Embryonen wurden mit 0,4 mg/mL Pronase E in 1x E3-Puffer dechorionisiert (Westerfield, M.; 2000). Dazu wurden die Zebrafischembryonen aus der Petrischale in ein Becherglas überführt. Der 1x E3-Puffer wurde abgenommen und mit 5 mL Pronase E Lösung aufgefüllt. Die Zebrafischembryonen wurden für 30 min in der Pronase E Lösung inkubiert. Nachdem sich das Chorion aufgelöst hatte, wurden die Zebrafischembryonen mit 1x E3-Puffer gewaschen um Überreste der

Membran zu entfernen. Zur Betrachtung der Embryonen nach 48 h wurde nach 24 h der E3-Puffer ausgetauscht. Vor der Untersuchung wurden erneut abgestorbenen Embryonen mittels Einwegpasteurpipetten entfernt.

Um auf eine mögliche EGFP-Expression hin zu untersuchen, wurden die Zebrafischembryonen auf einen Objektträger überführt und mit 0,2%iger Tricainlösung (Ethyl-3-aminobenzoate-methanesulfonate) anästhesiert. Die Betrachtung der Zebrafischembryonen erfolgte mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops (Zeiss LSM 510). EGFP-Expression wurde nur in normal entwickelten Zebrafischembryonen dokumentiert. Fotografische Aufnahmen erfolgten mit einer Zeiss AxioCam Farbkamera. Die Aufnahmen erfolgten mit Fluoreszenzlicht sowie im Hellfeld. Beide Bilder wurden im Anschluss überlagert um den Ort der Expression zu bestimmen. Weiterhin wurden Z-Stapel aufgenommen und mit der „Extended Focus“ Funktion der AxionVision Software überlagert.

2.4 Bestimmung von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren

Zur Vorhersage potentieller TFB wurde das „Transcription Factor Affinity Prediction Web Tool“ (Dr. A. Hufton Max-Planck-Institut für molekulare Genetik) verwendet. Dabei handelt es sich um einen experimentellen, noch nicht publizierten Algorithmus. Der Algorithmus implementiert Vorhersagemethoden für Bindungsaffinitäten von Transkriptionsfaktoren beschrieben in Manke *et al.* (2008), Roider *et al.* (2007) und Manke *et al.* (2010)

3 Ergebnisse

Die homologen CNS aus dem 3'UTR des *shh*-Gens der Maus (*Mus musculus*) und des Huhns (*Gallus gallus*) wurden bereits durch O. Herrmann von genomischer DNA amplifiziert, in den Vektor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Die Amplifikation der CNS für die Injektion erfolgte von diesem Plasmid. Um die *in vivo*-Aktivität der injizierten Fragmente zu analysieren, wurden die PCR-Produkte der Fragmente mit einem β -globin-EGFP-Reportergerkonstrukt in ein 1-4-Zellstadium der Zebrafischembryonen co-injiziert.

Jedes Fragment wurde in mindestens 525 Zebrafischembryonen injiziert. 175 Embryonen desselben Fischtanks wurden nicht injiziert, um die Grundsterblichkeit der Zebrafischembryonen zu bestimmen. Weiterhin wurden 175 Zebrafischembryonen mit einer etablierten Positivkontrolle per Co-Injektion injiziert. Dazu diente das 597 bp große Fragment aus dem 3'UTR des *shha*-Gens des Kugelfisches (*T. rubripes*). Dieses induziert eine starke EGFP-Expression in Muskelzellen (Woolfe *et al.*, 2005; Hermann, 2009). Die Positivkontrolle diente der Abschätzung der Variation während des Injektionsvorganges.

Die Auswertung der ersten Co-Injektionen des 913 bp großen CNE aus Maus (Maus_F/R) zeigte, dass dieses eine starke EGFP-Expression in Muskel- und Nervengewebe induziert. Um die Effektivität des Injektionsvorganges besser abschätzen zu können, wurde dieses Fragment daraufhin als Positivkontrolle eingesetzt.

3.1 Mikroinjektion des konservierten nicht-codierenden Elements aus Maus (*Mus musculus*)

Die Co-Injektion des 913 bp großen CNE aus dem 3'UTR des *shh*-Gens der Maus (*M. musculus*) führte in 24 h alten Zebrafischembryonen zu einer EGFP-Expression vor allem im Muskelgewebe (Abbildung 8). Vereinzelt wurde EGFP auch in Teilen des Nervensystems exprimiert. Von 525 injizierten Embryonen entwickelten sich 127 normal. 91 von diesen zeigten eine EGFP-Expression (Tabelle 12). Die Expressionsrate lag bei 71,65 % der normal entwickelten Embryonen.

Tabelle 12: Mikroinjektion des 913 bp großen CNE aus dem 3'UTR des *shh*-Gens der Maus (*M. musculus*)

Die injizierten Zebrafischembryonen wurden nach 24 h auf EGFP-Expression hin untersucht.

Injiziertes Fragment	Größe des CNS in bp	Injizierte Zebrafisch-embryonen	Normal entwickelte Zebrafischembryonen		EGFP-positive, normal entwickelte Zebrafischembryonen	
			Anzahl	in %	Anzahl	in %
Maus_F/R	913	525	127	24,19	91	71,65



Abbildung 8: Expressionsmuster des regulatorischen Elements aus dem 3'UTR des *shh*-Gens der Maus (*M. musculus*) in Zebrafischembryonen.

Der Zebrafischembryo zeigt EGFP-Expression (grün) in der Muskulatur. Das Leuchten des Dotters ist auf eine Autofluoreszenz zurückzuführen, nicht auf das EGFP-Reporterkonstrukt. Der Embryo ist mit dem anterioren Pol nach rechts und der dorsalen Seite nach oben ausgerichtet.

Fluoreszenzaufnahme mit Hellfeldüberlagerung (50 % Bildanteil)

Aufgrund der hohen Expressionsrate des EGFP wurde das 913 bp große Maus_F/R-Fragment für alle folgenden Co-Injektionen als Positivkontrolle eingesetzt. Dabei wurden bei jedem Injektionsversuch je 175 Zebrafischembryonen mit dem Maus_F/R-Fragment injiziert. Dadurch konnten die natürlichen Schwankungen des Injektionsvorgangs besser verglichen werden.

Insgesamt wurden 1575 Embryonen mit dem Maus_F/R-Fragment co-injiziert und nach 24 h auf EGFP-Expression untersucht. Von 1575 injizierten Embryonen entwickelten sich 318 normal. 164 von diesen zeigten eine EGFP-Expression im Muskelgewebe und vereinzelt auch in Nervenzellen (Tabelle 13). Die Expressionsrate lag bei 51,57 % der normal entwickelten Embryonen.

Tabelle 13: Auswertung aller Mikroinjektionen des 913 bp großen Maus_F/R-Fragments
Die injizierten Zebrafischembryonen wurden nach 24 h auf EGFP-Expression hin untersucht.

Injiziertes Fragment	Größe des CNS in bp	Injizierte Zebrafischembryonen	Normal entwickelte Zebrafischembryonen		EGFP-positive, normal entwickelte Zebrafischembryonen	
			Anzahl	in %	Anzahl	in %
Maus_F/R	913	1575	318	20,19	164	51,57

3.2 Progressive Kürzung der homologen Sequenz aus dem 3'UTR des *shh*-Gens der Maus (*Mus musculus*)

Zur Identifizierung einer möglichen TFB innerhalb der 913 bp großen regulatorischen Sequenz aus dem 3'UTR des *shh*-Gens der Maus (*M. musculus*) wurde die Sequenz mittels PCR progressiv verkürzt. Die hergestellten PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese auf ihre Größe hin überprüft. Mit Hilfe der gekürzten Fragmente lassen sich Rückschlüsse auf mögliche Bindungsmotive, die an der Aktivierung der Expression beteiligt sind, ziehen.

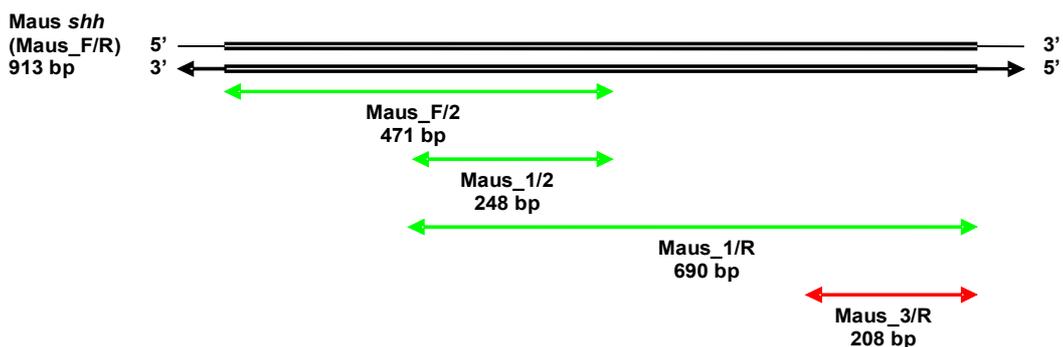


Abbildung 9: Verkürzte Fragmente der Maus_F/R-Sequenz, die mittels Co-Injektion getestet wurden

Die oberen beiden Balken symbolisieren den konservierten Bereich des 3'UTR des *shh*-Gens der Maus (*M. musculus*). Grüne Pfeile stellen die verkürzten PCR-Fragmente dar, die eine Expression induzierten. Fragmente, die mit roten Pfeilen dargestellt sind, zeigten keine EGFP-Expression. Die injizierten Zebrafischembryonen wurden nach 24 h auf Expression hin untersucht.

Von vier hergestellten Fragmenten zeigten drei nach 24 h die typische Expression von EGFP vornehmlich im Muskel (Abbildung 9). Vereinzelt wurde EGFP auch in Nervenzellen exprimiert. Die Zusammenfassung der Co-Injektions-Experimente ist in Tabelle 14 dargestellt.

Das 471 bp große Maus_F/2-Fragment zeigte eine EGFP-Expression in 48 der 70 normal entwickelten Zebrafischembryonen. Das entspricht einer Expressionsrate von ca. 69 %. Weiterhin induzierte Maus_1/R (690 bp) eine EGFP-Expression in 49 von 139 normal entwickelten Zebrafischembryonen, was einer Expressionsrate von 35,25 % entspricht. Auch das 248 bp große Fragment Maus_1/2 induzierte eine EGFP-Expression. Von 113 normal

entwickelten Zebrafischembryonen zeigten 19 EGFP-Signale. Das entspricht einer Expressionsrate von 16,81 %.

Das Fragment Maus_3/R zeigte als einziges nicht das typische Expressionsmuster. Lediglich ein Zebrafischembryo, von 175 normal entwickelten, zeigte eine EGFP-Expression in Hautzellen ventral der Schwanzflosse.

Das Fragment Maus_1/2 ist in allen Fragmenten aus dem 3'UTR des *shh*-Gens der Maus (*M. musculus*) enthalten, die eine Expression von EGFP hervorrufen. Die 248 bp Sequenz scheint demnach essentiell für eine EGFP-Expression zu sein.

Exemplarisch für die EGFP-Expression der getesteten Fragmente wurde das Expressionsmuster des Maus_1/R Fragments dargestellt (Abbildung 10).

Tabelle 14: Mikroinjektion der progressiv gekürzten Fragmente aus dem 3'UTR des *shh*-Gens der Maus (*M. musculus*)

Die injizierten Zebrafischembryonen wurden nach 24 h auf EGFP-Expression hin untersucht.

Injiziertes Fragment	Größe des CNS in bp	Injizierte Zebrafisch-embryonen	Normal entwickelte Zebrafischembryonen		EGFP-positive, normal entwickelte Zebrafischembryonen	
			Anzahl	in %	Anzahl	in %
Maus_F/R	913	1575	318	20,19	164	51,57
Maus_F/2	471	525	70	13,33	48	68,57
Maus_1/R	690	1050	139	13,24	49	35,25
Maus_1/2	248	1050	113	10,76	19	16,81
Maus_3/R	208	1050	175	16,67	1	0,57

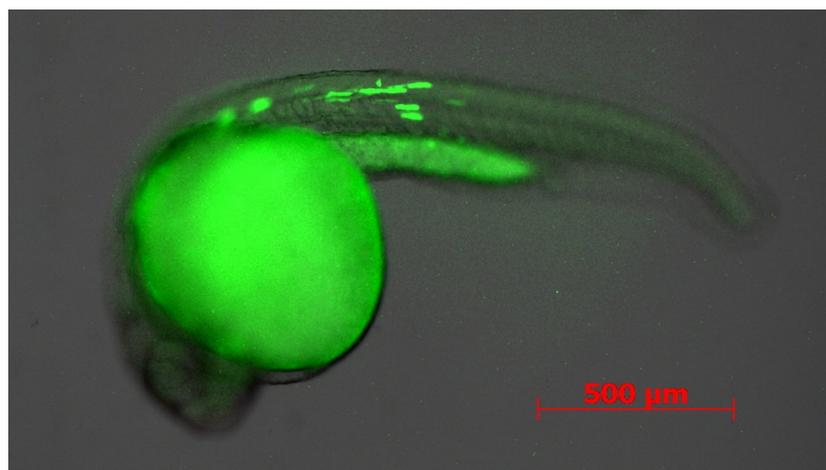


Abbildung 10: Expressionsmuster des Maus_1/R-Fragments aus dem 3'UTR des *shh*-Gens der Maus (*M. musculus*) in Zebrafischembryonen 24 hpf

Der Zebrafischembryo zeigt EGFP-Expression (grün) in der Muskulatur. Das Leuchten des Dotters ist auf eine Autofluoreszenz zurückzuführen, nicht auf das EGFP-Reporterkonstrukt. Der Embryo ist mit dem anterioren Pol nach links und der dorsalen Seite nach oben ausgerichtet. Fluoreszenzaufnahme mit Hellfeldüberlagerung (30 % Bildanteil)

3.3 Mikroinjektion des konservierten nicht-codierenden Elements aus Huhn (*Gallus gallus*)

Die Co-Injektion des 1098 bp großen Fragments aus dem 3'UTR des *shh*-Gens des Huhns (*G. gallus*) führte in 24 h alten Zebrafischembryonen vereinzelt zu einer spezifischen EGFP-Expression in Hautzellen ventral der Schwanzflosse (Abbildung 11). Von 1050 injizierten Zebrafischembryonen entwickelten sich 156 normal, was einer Überlebensrate von 14,86 % entspricht. Nur 5 Embryonen exprimierten EGFP in Hautzellen ventral der Schwanzflosse (Tabelle 15).

Tabelle 15: Mikroinjektion des 1098 bp großen CNE aus dem 3'UTR des *shh*-Gens des Huhns (*G. gallus*)

Die injizierten Zebrafischembryonen wurden nach 24 h auf EGFP-Expression hin untersucht.

Injiziertes Fragment	Größe des CNS in bp	Injizierte Zebrafischembryonen	Normal entwickelte Zebrafischembryonen		EGFP-positive, normal entwickelte Zebrafischembryonen	
			Anzahl	in %	Anzahl	in %
Chicken_shh	1098	1050	156	14,86	5	3,21



Abbildung 11: Expressionsmuster des regulatorischen Elements aus dem 3'UTR des *shh*-Gens des Huhns (*G. gallus*) in Zebrafischembryonen 24 hpf

Der Zebrafischembryo zeigt EGFP-Expression (grün) in einer Hautzelle ventral der Schwanzflosse (blauer Pfeil). Das Leuchten des Dotters ist auf eine Autofluoreszenz zurückzuführen, nicht auf das EGFP-Reporterkonstrukt. Der Embryo ist mit dem anterioren Pol nach links und der dorsalen Seite nach oben ausgerichtet.

Fluoreszenzaufnahme mit Hellfeldüberlagerung (50 % Bildanteil)

Die Embryonen wurden in E3-Puffer aufbewahrt und nach 48 h noch einmal auf EGFP-Expression untersucht. Nach 48 h waren noch 146 normal entwickelte Zebrafischembryonen am Leben. Davon zeigten 49 eine EGFP-Expression. Die Expressionsrate nach 48 h betrug 33,56 % (Tabelle 16).

Tabelle 16: Mikroinjektion des 1098 bp großen CNE aus dem 3'UTR des *shh*-Gens des Huhns (*G. gallus*)

Die injizierten Zebrafischembryonen wurden nach 48 h auf EGFP-Expression hin untersucht.

Injiziertes Fragment	Größe des CNS in bp	Injizierte Zebrafisch-embryonen	Normal entwickelte Zebrafischembryonen		EGFP-positive, normal entwickelte Zebrafischembryonen	
			Anzahl	in %	Anzahl	in %
Chicken_ <i>shh</i>	1098	525	146	27,81	49	33,56

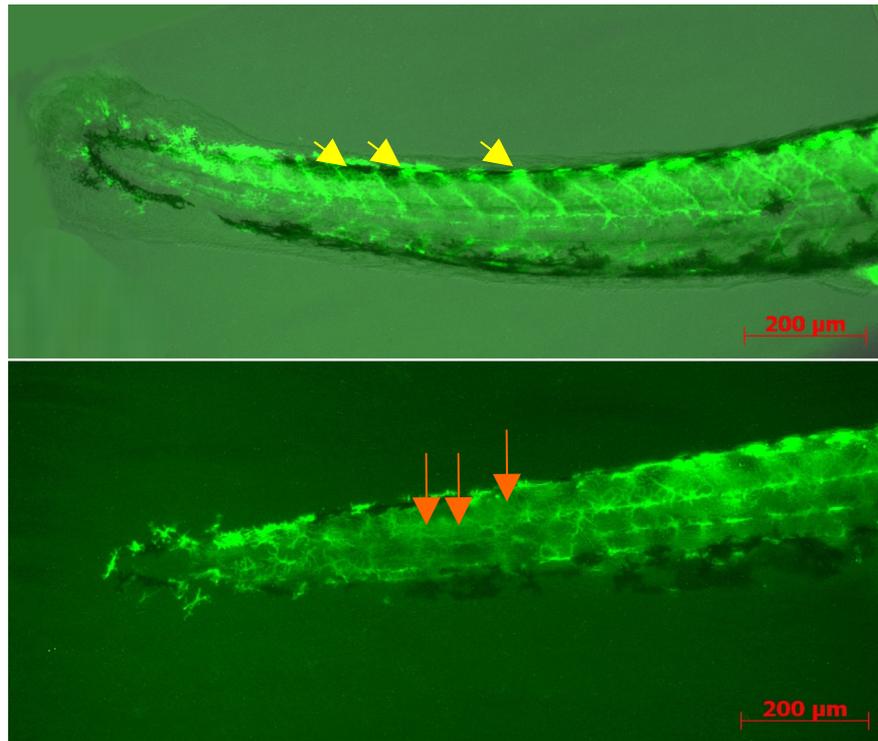


Abbildung 12: Expressionsmuster des regulatorischen Elements aus dem 3'UTR des *shh*-Gens des Huhns (*Gallus gallus*) in Zebrafischembryonen 48 hpf

Die Zebrafischembryonen zeigen EGFP-Expression (grün) in Zellen des „dorsal stripe“ (gelbe Pfeile) und in Nervenzellen (orange Pfeile). Die Embryonen sind mit dem anterioren Pol nach rechts und der dorsalen Seite nach oben ausgerichtet.

Fluoreszenzaufnahme mit Hellfeldüberlagerung (20-30 % Bildanteil)

Die Expression war in Zellen des „dorsal stripe“ (dorsal gelegener, pigmentierter Melanocyten-Streifen) und in Nervenzellen nachzuweisen (Abbildung 12).

Aus Zeitgründen konnte die regulatorische Sequenz aus dem 3'UTR des *shh*-Gens aus Huhn nicht progressiv verkürzt werden um potentielle TFB zu identifizieren.

3.4 Untersuchung der, mit Huhn- und gekürzten Maus-Fragmenten, co-injizierten Zebrafischembryonen 48 hpf

Nachdem festgestellt wurde, dass das CNE aus dem 3'UTR des *shh*-Gens aus dem Huhn (*G. gallus*) nach 48 h eine EGFP-Expression induziert, wurden weitere Co-Injektionen durchgeführt, um signifikante Aussagen über das Expressionsverhalten der Fragmente Maus_F/R, Maus_1/2, Maus_3/R und Chicken_shh nach 48 h treffen zu können. Es sollte untersucht werden, ob sich das Expressionsmuster der verkürzten Fragmente aus der Maus (*M. musculus*) (siehe 3.2) nach 48 h eventuell verändert.

Tabelle 17: Mikroinjektion der CNE aus dem 3'UTR des *shh*-Gens aus Maus (*M. musculus*) und Huhn (*G. gallus*)

Die injizierten Zebrafischembryonen wurden nach 48 h auf EGFP-Expression hin untersucht.

Injiziertes Fragment	Größe des CNS in bp	Injizierte Zebrafisch-embryonen	Normal entwickelte Zebrafischembryonen		EGFP-positive, normal entwickelte Zebrafischembryonen	
			Anzahl	in %	Anzahl	in %
Maus_F/R	913	1050	337	32,10	277	82,20
Maus_1/2	248	1050	234	22,29	228	97,44
Maus_3/R	208	525	149	28,38	1	0,67
Chicken_shh	1098	1050	300	28,57	169	56,33

Die Überlebensrate der Fische lag bei den getesteten Fragmenten bei 22 - 32 % (Tabelle 17). Die Fragmente Maus_F/R, Maus_1/2 und Chicken_shh zeigten nach 48 h ein anderes Expressionsmuster, als nach 24 h. Maus_3/R zeigte keine spezifische Expression von EGFP. 149 der 525 co-injizierten Zebrafischembryonen entwickelten sich normal. Ein Embryo zeigte ein EGFP-Signal in einer einzelnen Muskelzelle (Tabelle 17).

Das Maus_F/R-Fragment zeigte eine EGFP-Expression in 227 der 337 normal entwickelten Zebrafischembryonen. Das entspricht einer Expressionsrate von ca. 82 %. Weiterhin induzierte Maus_1/2 eine EGFP-Expression in 228 von 234 normal entwickelten Zebrafischembryonen, was einer Expressionsrate von 97,44 % entspricht. Auch das Fragment Chicken_shh induzierte eine EGFP-Expression. Von 300 normal entwickelten Zebrafischembryonen zeigten 169 EGFP-Signale. Das entspricht einer Expressionsrate von 56,33 % (Tabelle 17).

Die drei positiv getesteten Fragmente induzierten eine EGFP-Expression in multiplen Gewebetypen der Zebrafischembryonen. Die Maus-Fragmente zeigten überwiegend EGFP in Zellen der Muskulatur, des Nervensystems einschließlich des Gehirns und des „dorsal stripe“. Vereinzelt kam es auch zur EGFP-Expression in Hautzellen ventral der Schwanzflosse, in Herzzellen und in Pigmentzellen der Iris (Abbildung 13). Das Fragment Chicken_shh induzierte die Expression von EGFP vornehmlich in Zellen des Nervensystems

einschließlich des Gehirns und Zellen des „dorsal stripe“. In geringem Maß kam es zusätzlich zur Expression Hautzellen ventral der Schwanzflosse, Herzzellen und Muskelzellen (Abbildung 13).

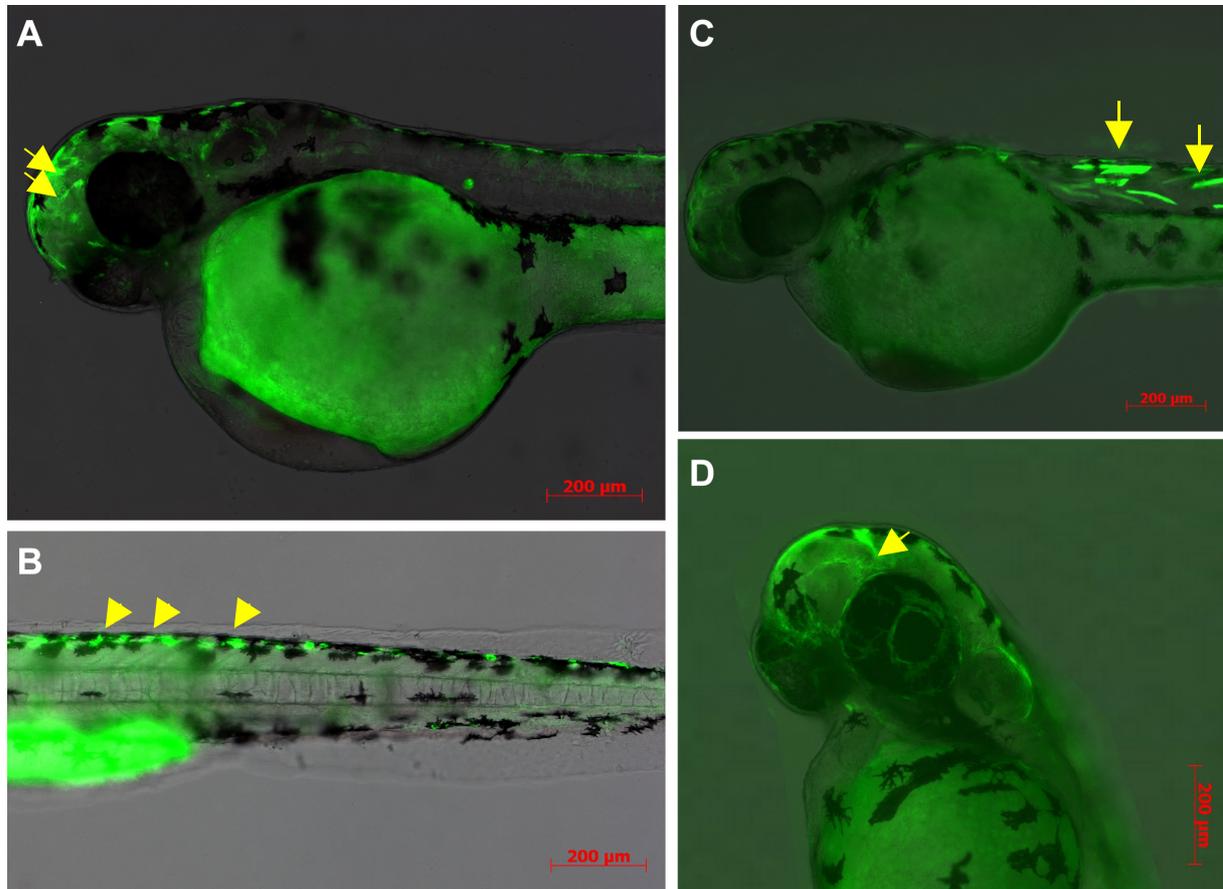


Abbildung 13: Expressionsmuster des EGFP in Zebrafischembryonen 48 hpf nach Co-Injektion der CNE aus Maus (*M. musculus*) und Huhn (*G. gallus*)

Die Injektion von Maus_1/2 induzierte Expression **A**) im Gehirn und **B**) im „dorsal stripe“.

Die Injektion von Maus_F/R induzierte Expression in Muskelzellen **C**). Die Injektion von Chicken_shh induzierte Expression im Gehirn **D**).

Das Leuchten des Dotters ist auf eine Autofluoreszenz zurückzuführen, nicht auf das EGFP-Reporterkonstrukt. Die Embryonen A, B und C sind mit dem anterioren Pol nach links und der dorsalen Seite nach oben ausgerichtet. D ist mit dem anterioren Pol nach oben und der dorsalen Seite nach rechts ausgerichtet. EGFP-Expression (grün)

Fluoreszenzaufnahmen mit Hellfeldüberlagerung (20-50 % Bildanteil)

Die EGFP-Expression beschränkte sich innerhalb eines Fisches meist nicht auf ein Gewebe. Abbildung 14 zeigt die Verteilung der EGFP-Expression als Anteil der EGFP-positiven, normal entwickelten Zebrafischembryonen. Die Expression von EGFP in Zellen des „dorsal stripe“ und des Nervensystems konnte nach 24 h nicht nachgewiesen werden. Nach 48 h ist diese jedoch in mehr als 50 % aller EGFP-positiv getesteten, normal entwickelten Zebrafischembryonen vorhanden. Weiterhin ist auffällig, dass die EGFP-Expression in Hautzellen ventral der Schwanzflosse, induziert durch Chicken_shh, auf rund 6 % angestiegen ist (Abbildung 14).

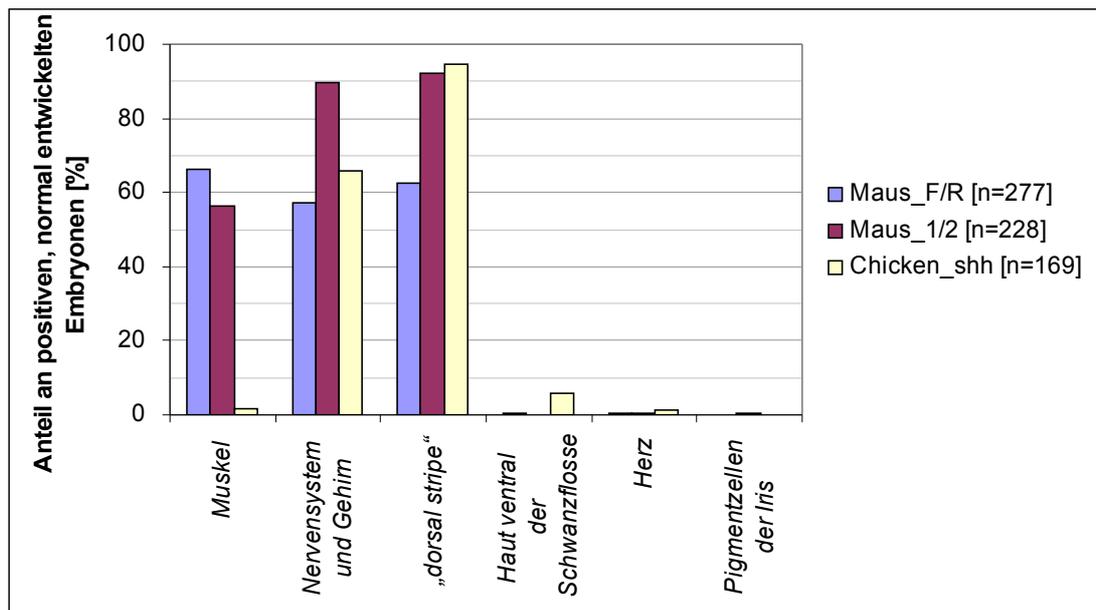


Abbildung 14: Verteilung der EGFP-Expression innerhalb verschiedener Gewebe der EGFP-positiven, normal entwickelten Zebrafischembryonen 48 hpf

Die Anzahl der positiven, normal entwickelten Zebrafischembryonen entspricht 100 %. EGFP wurde in mehreren Gewebetypen eines Fisches exprimiert, daher kommt es zu Überschneidungen der Expressionsmuster.

3.5 Mikroinjektion der konservierten nicht-codierenden Elemente aus Huhn (*Gallus gallus*) und Maus (*Mus musculus*) in Albino-Zebrafische

Nach 24 h setzt die Pigmentierung in den Zebrafischembryonen ein. Nach 48 h ist die Pigmentierung soweit fortgeschritten, dass Melanocyten innerhalb von bis zu vier Streifenregionen (dorsaler, lateraler, ventraler und Dottersack-Streifen) sichtbar sind. Weiterhin ist die Iris der Fische bereits pigmentiert. Diese melaninhaltigen Zellen erschweren die Analyse der EGFP-Expression, da die Signale durch die dunklen Zellen verdeckt werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Fragmente ebenfalls in Albino-Zebrafischen getestet. Zebrafische des Genotyps *albino* (*alb*) besitzen einen Defekt innerhalb der Melaninsynthese. Daher sind die Melanocyten sehr hell bzw. unpigmentiert. Die Anzahl und Form der Melanocyten ist dennoch normal.

Tabelle 18: Mikroinjektion der CNE aus dem 3'UTR des *shh*-Gens aus Maus (*M. musculus*) und Huhn (*G. gallus*) in Albino-Zebrafische

Die injizierten Zebrafischembryonen wurden nach 48 h auf EGFP-Expression hin untersucht.

Injiziertes Fragment	Größe des CNS in bp	Injizierte Zebrafisch-embryonen	Normal entwickelte Zebrafischembryonen		EGFP-positive, normal entwickelte Zebrafischembryonen	
			Anzahl	in %	Anzahl	in %
Maus_F/R	913	525	77	14,67	68	88,31
Maus_1/2	248	525	53	10,10	52	98,11
Chicken_shh	1098	525	70	13,33	49	70,00

Die Überlebensrate der Albino-Fische fiel 10 - 15 % geringer aus, als bei den Wildtyp-Fischen (Tabelle 18). Das Maus_F/R-Fragment zeigte eine EGFP-Expression in 68 der 77 normal entwickelten Zebrafischembryonen. Das entspricht einer Expressionsrate von ca. 88 %. Weiterhin induzierte Maus_1/2 eine EGFP-Expression in 52 von 53 normal entwickelten Zebrafischembryonen, was einer Expressionsrate von 98,11 % entspricht. Auch das Fragment Chicken_shh induzierte eine EGFP-Expression. Von 70 normal entwickelten Zebrafischembryonen zeigten 49 EGFP-Signale. Das entspricht einer Expressionsrate von 70 % (Tabelle 18).

Alle drei getesteten Fragmente induzierten eine EGFP-Expression in multiplen Gewebetypen der Albino-Zebrafischembryonen. Die Expressionsmuster waren identisch zu den Expressionsmuster der Wildtyp-Fische (siehe 3.4). Durch die Verwendung der Albino-Zebrafische kann hier klar gezeigt werden, dass es sich bei den EGFP exprimierenden Zellen im „dorsal stripe“ um Melanozyten handelt. Diese sind vorhanden, bilden jedoch kein Melanin in Albino-Fischen.

Die Maus-Fragmente exprimieren überwiegend EGFP in Zellen der Muskulatur, des Nervensystems einschließlich des Gehirns und in Melanocyten des „dorsal stripe“. Vereinzelt kam es auch zur EGFP-Expression in Hautzellen ventral der Schwanzflosse und in Pigmentzellen der Iris (Abbildung 15). Das Chicken_shh-Fragment induzierte die Expression von EGFP vornehmlich in Zellen des Nervensystems einschließlich des Gehirns und Melanocyten des „dorsal stripe“. Außerdem kam es vereinzelt zur EGFP-Expression in Hautzellen ventral der Schwanzflosse, Pigmentzellen der Iris und Muskelzellen (Abbildung 15).

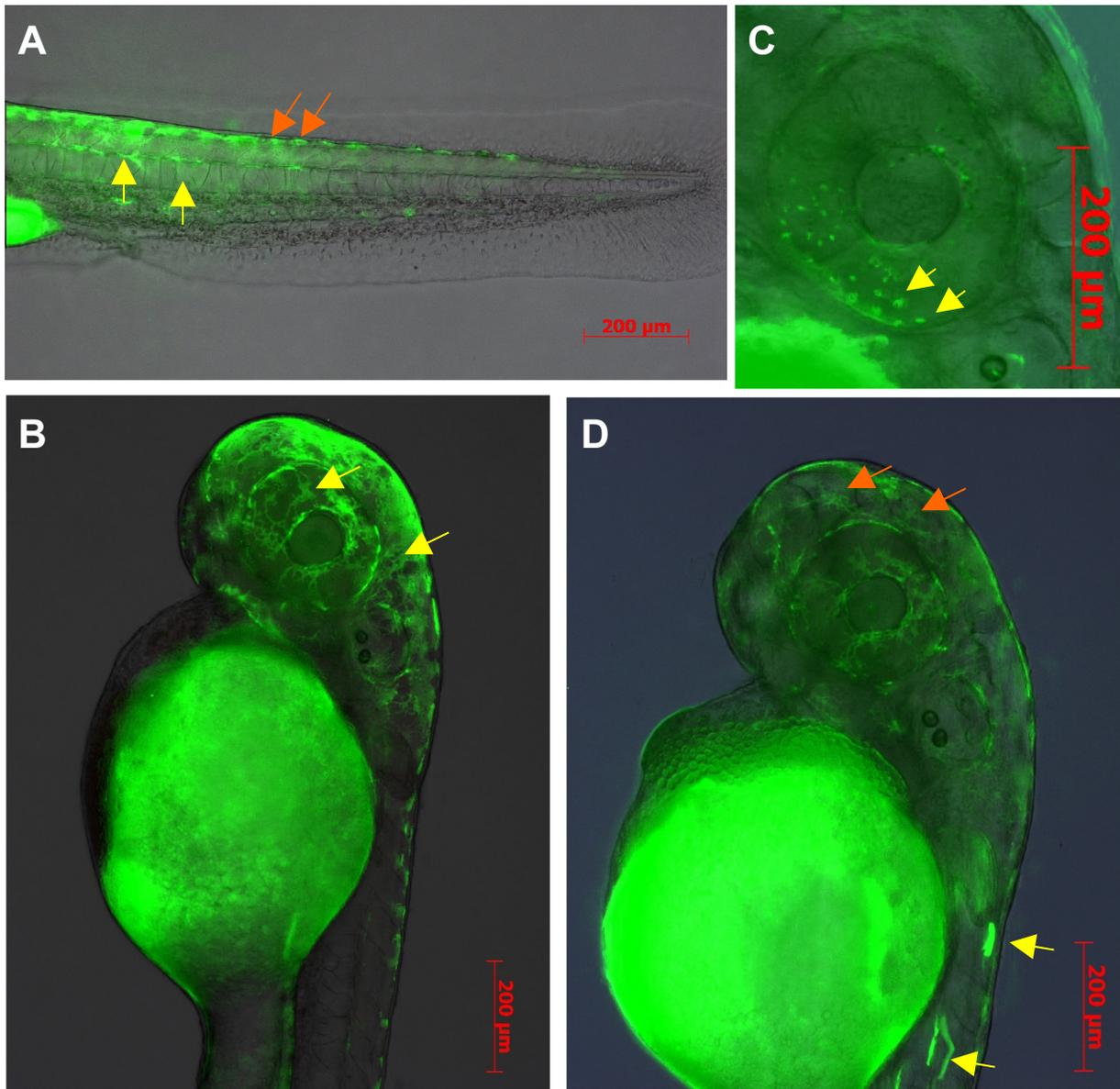


Abbildung 15: Expressionsmuster des EGFP in Albino-Zebrafischembryonen 48 hpf nach Co-Injektion der CNE aus Maus (*M. musculus*) und Huhn (*G. gallus*)

Die Injektion von Chicken_shh induzierte Expression **A**) im „dorsal stripe“ (orange Pfeile) und in Neuronen (gelbe Pfeile) und **B**) im Gehirn und in Neuronen. Die Injektion von Maus_F/R induzierte Expression **C**) in Pigmentzellen der Iris und **D**) im Gehirn (orange Pfeile) und in Muskelzellen (gelbe Pfeile).

Das Leuchten des Dotters ist auf eine Autofluoreszenz zurückzuführen, nicht auf das EGFP-Reporterkonstrukt. Die Embryonen B, C und D sind mit dem anterioren Pol nach oben und der dorsalen Seite nach rechts ausgerichtet. A ist mit dem anterioren Pol nach links und der dorsalen Seite nach oben ausgerichtet. EGFP-Expression (grün)

Fluoreszenzaufnahmen mit Hellfeldüberlagerung (20-50 % Bildanteil)

Die EGFP-Expression beschränkte sich innerhalb eines Fisches meist nicht auf ein Gewebe. Abbildung 16 zeigt die Verteilung der EGFP-Expression als Anteil der EGFP-positiv getesteten, normal entwickelten Zebrafischembryonen. Nach 48 h ist die EGFP-Expression im „dorsal stripe“ und im Nervensystem in 70 - 90 % der EGFP-positiven, normal entwickelten Zebrafischembryonen vorhanden. Die Fragmente der Maus zeigen nach wie vor

eine EGFP-Expression in Muskelzellen in ca. 60 % der EGFP-positiv getesteten, normal entwickelten Zebrafischembryonen vorhanden

Die Co-Injektion von Chicken_shh induzierte eine EGFP-Expression in Hautzellen ventral der Schwanzflosse in rund 16 % der EGFP-positiven, normal entwickelten Zebrafischembryonen. Dieses Expressionsmuster zeigt sich bei der Co-Injektion von Maus-Fragmenten nur in 0 - 6 % der EGFP-positiven Fische.

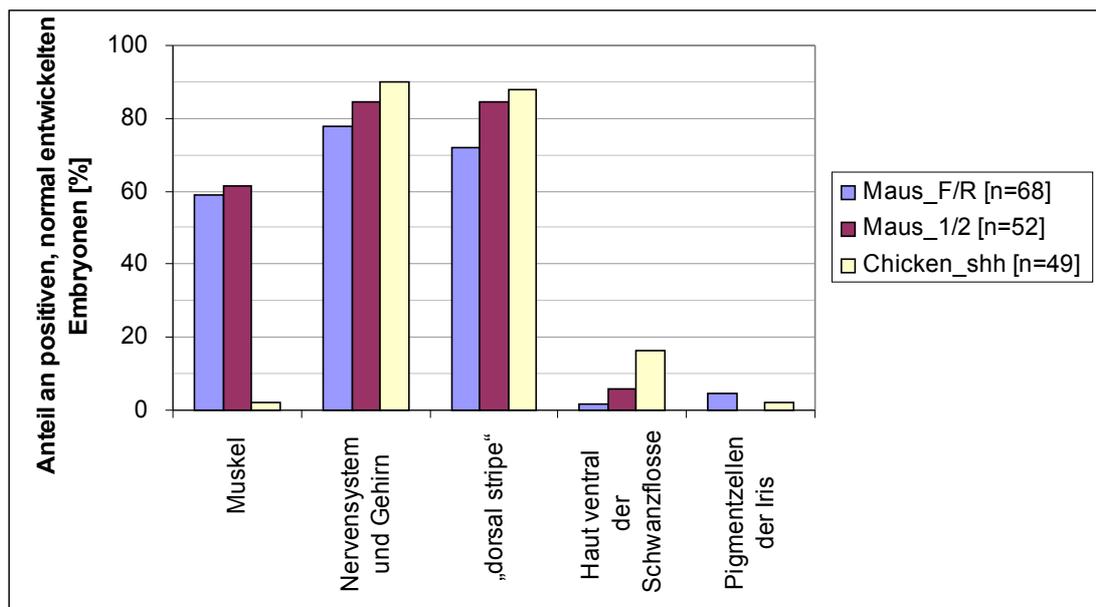


Abbildung 16: Verteilung der EGFP-Expression innerhalb verschiedener Gewebe der EGFP-positiven, normal entwickelten Albino-Zebrafischembryonen 48 hpf

Die Anzahl der positiven, normal entwickelten Zebrafischembryonen entspricht 100 %. EGFP wurde in mehreren Gewebetypen eines Fisches exprimiert, daher kommt es zu Überschneidungen der Expressionsmuster.

Mit Hilfe der Co-Injektion in Albino-Zebrafische konnten die Ergebnisse der Analyse auf EGFP-Expression nach 48 h verifiziert werden. Eine EGFP-Expression in weiteren Gewebetypen wurde nicht festgestellt.

3.6 Identifikation potentieller Transkriptionsfaktorbindestellen innerhalb der Maus - Sequenz (*Mus musculus*)

Um potentielle TFB zu identifizieren wurde das nicht publizierte „Transcription Factor Affinity Prediction Web Tool“ (Dr. A. Hufton, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik) verwendet. Mit Hilfe der Anwendung ist es möglich eine Sequenz auf mögliche TFB zu untersuchen. Außerdem können auch mehrere Sequenzen in Bezug auf ihre TFB verglichen werden. Die Analyse des 248 bp langen Maus_1/2-Fragments zeigte, dass innerhalb der Sequenz statistisch signifikante Bindestellen für 25 verschiedene TF lokalisiert sind. Diese TFB weisen

einen p-Wert $< 0,05$ auf. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Übereinstimmung zwischen TFB und der analysierten Sequenz zufällig ist, liegt damit bei $< 5\%$.

Unter anderem wurden innerhalb der Maus_1/2-Sequenz zwei TFB für Mef2a (myocyte-specific enhancer factor 2A) gefunden. Eine dieser TFB liegt im konservierten Bereich (Abbildung 17). Die Interaktion von Mef2a mit einer der beiden TFB führt möglicherweise zur EGFP-Expression in Muskelzellen 24 h alter Zebrafischembryonen.

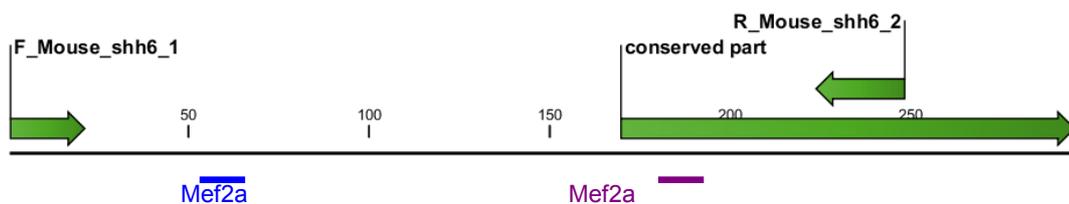


Abbildung 17: Identifizierte Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Mef2a innerhalb des Maus_1/2 Fragments

Bindestellen dargestellt in blau und violett

Um festzustellen welche Sequenz essentiell ist um eine EGFP-Expression zu induzieren, muss die Sequenz weiter verkürzt werden. Aus Zeitgründen konnten diese Untersuchungen nicht mehr durchgeführt werden.

4 Diskussion

4.1 Das 248 bp große Maus-Fragment induziert EGFP-Expression in Muskelzellen 24 hpf

Die Co-Injektion des 913 bp großen CNE aus dem 3'UTR des *shh*-Gens der Maus (*Mus musculus*) induzierte in 24 h alten Zebrafischembryonen eine EGFP-Expression in Muskelzellen. Eine progressive Verkürzung des Fragments sollte zeigen welcher Teil der Sequenz verantwortlich für die Expression ist. Das Fragment Maus_3/R lieferte hingegen keine spezifische EGFP-Expression. Lediglich einer von 175 normal entwickelten Zebrafischembryonen zeigte ein EGFP-Signal in einer einzelnen Hautzelle ventral der Schwanzflosse. Dieses Ergebnis konnte nicht reproduziert werden und ist statistisch nicht signifikant. Die Expression ist wahrscheinlich auf ein zufälliges Ereignis zurückzuführen. Möglicherweise kam es innerhalb dieser Zelle zu einer Integration von DNA des Reporterkonstrukts ins Genom.

Es konnte gezeigt werden, dass alle Fragmente, die ein positives EGFP-Signal hervorbringen, das Fragment Maus_1/2 enthalten. Es ist daher davon auszugehen, dass die TFB, welche die EGFP-Expression in den Muskelzellen aktiviert, innerhalb der 248 bp großen Maus_1/2 Sequenz liegt. Die Sequenz Maus_1/2 wurde mit Hilfe des „Transcription Factor Affinity Prediction Web Tools“ auf potentielle TFB untersucht. Der Vorteil dieses „Web Tools“ ist, dass die Anzahl der verfügbaren TFB umfangreicher ist als bei vergleichbaren Anwendungen wie zum Beispiel rVISTA (www.rvista.dcode.org). So konnten Bindestellen für 25 TF vorhergesagt werden. Diese 25 TF besitzen eine hohe Bindeaffinität zur DNA-Sequenz, charakterisiert durch einen geringen p-Wert ($< 0,05$).

Zwei der gefundenen TFB sind Bindestellen für Mef2a, wobei eine innerhalb des konservierten Bereichs der Sequenz liegt. Die Familie der Mef2-Transkriptionsfaktoren reguliert unter anderem Skelettmuskulatur-spezifische Gene während der Embryonalentwicklung (Ticho *et al.* 1996, Naya & Olsen 1999). Aus diesem Grund könnten die gefundenen TFB verantwortlich für die EGFP-Expression im Muskel sein. Die homologe, regulatorische Sequenz aus dem 3'UTR des *shha*-Gens vom Kugelfisch (*T. rubripes*) besitzt analoge Mef2a Bindestellen (Hermann, 2009). Die Sequenz aus Fugu induziert eine EGFP-Expression in Muskelzellen, identisch der des Maus-Fragments. Hermann (2009) konnte bereits zeigen, dass die Mef2a TFB innerhalb des konservierten Bereichs nicht für die EGFP-Expression verantwortlich ist. Daher würde man mit der Verkürzung des Maus-Fragments bei der Isolierung der Mef2a TFB „upstream“ des konservierten Bereichs

(Abbildung 17 (blau)) beginnen, was aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden konnte.

4.2 Das 248 bp große Maus-Fragment induziert EGFP-Expression in multiplen Gewebetypen 48 hpf

Die Untersuchung von 48 h alten Zebrafischembryonen, welche mit Maus-Fragmenten co-injiziert wurden, zeigte ein anderes Expressionsmuster des EGFP als 24 hpf Embryonen. Infolgedessen wurden weitere Co-Injektionen durchgeführt. Aufgrund der Eingrenzung des regulatorischen Bereichs auf das Maus_{1/2}-Fragment wurde dieses auf eine EGFP-Expression in Zebrafischembryonen (48 hpf) hin untersucht. Außerdem wurde das Fragment Maus_{3/R}, welches als einziges Fragment keine EGFP-Expression in 24 hpf Embryonen zeigte, co-injiziert, um potentielle Veränderungen des Expressionsmusters nach 48 h nachzuweisen.

Es konnte gezeigt werden, dass das CNE Maus_{1/3} keine spezifische Expression von EGFP in Zebrafischembryonen induziert. Lediglich ein Embryo zeigte EGFP-Expression in einer einzelnen Muskelzelle. Diese Expression ist wahrscheinlich auf ein zufälliges Ereignis zurückzuführen, daher ist davon auszugehen, dass die 208 Bp lange Sequenz Maus_{3/R} keine regulatorische Funktion in Form eines Enhancers besitzt. Eine Repressor-Funktion kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da bindende Repressoren mit diesem experimentellen Aufbau nicht nachgewiesen werden können.

Die Fragmente Maus_{F/R} und Maus_{1/2} zeigten, neben der EGFP-Expression im Muskel (24 hpf), EGFP-Signale in Zellen des „dorsal stripe“ und im Nervensystem der 48 h alten Embryonen. Weiterhin wurde EGFP in einem geringen Anteil der EGFP-positiven, normal entwickelten Zebrafischembryonen auch in Hautzellen ventral der Schwanzflosse, Herzzellen und Pigmentzellen der Iris nachgewiesen. Die Expression von EGFP zeigte sich dabei innerhalb eines Embryos in verschiedenen Gewebetypen.

Aufgrund der einsetzenden Pigmentierung der Fische nach 24 h war es schwierig die EGFP Expression nach 48 h genau zu lokalisieren. Aus diesem Grund wurden die Co-Injektionen mit Albino-Zebrafischen wiederholt. Die co-injizierten Fische zeigten nach 48 h das gleiche Expressionsmuster wie die Wildtyp-Fische. Durch die fehlende Pigmentierung konnte verifiziert werden, dass es sich bei EGFP-positiven Zellen des „dorsal stripe“ um Melanocyten handelt. Die Expression von EGFP nach 48 h in Zellen des „dorsal stripe“ korreliert mit der Expression innerhalb des Nervensystems. Eine Erklärung ist, dass Pigmentzellen wie Melanocyten und Neuronen ihren Ursprung in der Neuralleiste haben. Zellen der Neuralleiste differenzieren nach der Migration zu einer Vielzahl verschiedener

Zelltypen, die strukturierte Muster bilden (Eisen & Weston 1993). Daher lässt sich schließen, dass das Maus_{1/2}-Fragment eine regulatorische *in vivo*-Aktivität in der Neuralleiste besitzt. Um diese Vermutung näher zu untersuchen muss die CNS weiter eingegrenzt werden, um potentiell verantwortliche *cis*-regulatorische Elemente zu identifizieren. Da viele potentielle TFB gefunden wurden, lassen sich bislang nur Vermutungen anstellen. Nach einer Eingrenzung der CNS auf einen konkreten Bereich können einzelne potentielle TFB auf eine regulatorische *in vivo*-Funktion hin überprüft werden. Durch die Erzeugung von Mutationen mittels PCR innerhalb einer potentiellen TFB ließe sich überprüfen, ob die Bindestelle verantwortlich für das spezifische Expressionsmuster von EGFP ist. Einen weiteren möglichen Ansatz zur Identifikation von funktionellen TFB stellen Deletionsexperimente dar.

4.3 Co-Injektion des konservierten nicht-codierenden Elements aus Huhn (*Gallus gallus*)

Die Co-Injektion der CNS aus dem 3'UTR des *shh*-Gens aus Huhn (*G. gallus*) induzierte eine spezifische EGFP-Expression in Hautzellen ventral der Schwanzflossen in Zebrafischembryonen 24 hpf. Die Expressionsrate war allerdings mit ca. 3 % der EGFP-positiven, normal entwickelten Embryonen sehr gering. In 48 h alten Zebrafischembryonen änderte sich das Expressionsmuster drastisch. Die Expression von EGFP wurde in multiplen Gewebetypen induziert. 65 - 95 % der EGFP-positiven Fische zeigten eine Expression in Melanocyten des „dorsal stripe“ und Zellen des Nervensystems einschließlich des Gehirns. Außerdem konnte die EGFP-Expression in Hautzellen ventral der Schwanzflosse mit einer Expressionsrate von 6 - 16 % nachgewiesen werden. Die Co-Injektion der Maus-Fragmente zeigte eine Expression von EGFP in Hautzellen ventral der Schwanzflosse nur vereinzelt. Daher scheint dieses Expressionsmuster spezifisch für das CNE aus Huhn zu sein.

Weiterhin kam es zur Expression von EGFP in Herzzellen, Pigmentzellen der Iris und Muskelzellen. Die Expressionsraten dieser Gewebe lagen nur im einstelligen Prozentbereich und sind daher statistisch nicht signifikant.

Die Co-Injektion von Chicken_{shh} zeigte in Zebrafischembryonen 48 hpf das gleiche Expressionsmuster des EGFP wie Maus_{F/R} und Maus_{1/2}. Ausgenommen ist lediglich die Expression in Muskelzellen, die beim Maus-Fragment bereits nach 24 h nachzuweisen ist. Dieses Ergebnis wurde sowohl in Wildtyp- als auch in Albino-Fischen erzielt. Es ist davon auszugehen, dass Chicken_{shh} die gleiche regulatorische *in vivo*-Aktivität innerhalb der Neuralleiste besitzt wie Maus_{1/2}.

Die Vorgehensweise für anschließende Experimente verhält sich analog zur Vorgehensweise beim Maus-Fragment. Das Chicken_{shh}-Fragment muss zunächst progressiv so stark wie möglich verkürzt werden. Anschließend können mithilfe des

„Transcription Factor Affinity Prediction Web Tools“ *cis*-regulatorische Elemente innerhalb der Sequenz vorhergesagt werden. Aufgrund der identischen Expressionsmuster von EGFP in 48 h alten Zebrafischembryonen ist davon auszugehen, dass der gleiche TF für die Aktivität innerhalb der Neuralleiste verantwortlich ist.

Aus Zeitgründen konnten die Experimente an dieser Stelle nicht weitergeführt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-10. doi: 10.1006/jmbi.1990.9999.
- Belfort, M., & Roberts, R. (1997). Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic acids research*, 25(17), 3379. Oxford Univ Press
- Boffelli, D., Nobrega, M. a., & Rubin, E. M. (2004). Comparative genomics at the vertebrate extremes. *Nature reviews. Genetics*, 5(6), 456-65. doi: 10.1038/nrg1350.
- Braun, Helene (2009): Diplomarbeit: "Funktionelle Analyse der konservierten nicht-kodierenden Elemente im Zebrafisch". Technische Universität Darmstadt
- Brudno, M., Do, C. B., Cooper, G. M., Kim, M. F., Davydov, E., Green, E. D., . . . , Batzoglu, S. (2003). LAGAN and Multi-LAGAN: efficient tools for large-scale multiple alignment of genomic DNA. *Genome research*, 13(4), 721-31. doi: 10.1101/gr.926603.
- Chang, B. E., Blader, P., Fischer, N., Ingham, P. W., & Strähle, U. (1997). Axial (HNF3beta) and retinoic acid receptors are regulators of the zebrafish sonic hedgehog promoter. *The EMBO journal*, 16(13), 3955-64. doi: 10.1093/emboj/16.13.3955.
- Elgar, G., & Vavouri, T. (2008). Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes. *Trends in genetics : TIG*, 24(7), 344-52. doi: 10.1016/j.tig.2008.04.005.
- Ertzer, R., Müller, F., Hadzhiev, Y., Rathnam, S., Fischer, N., Rastegar, S., Strähle, U. (2007). Cooperation of sonic hedgehog enhancers in midline expression. *Developmental biology*, 301(2), 578-89. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.004.
- Gaiano, N., Allende, M., Amsterdam, a., Kawakami, K., & Hopkins, N. (1996). Highly efficient germ-line transmission of proviral insertions in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 7777-82
- Georgi, Udo (2009) Diplomarbeit: "Vergleich von Co-Injektionsmethode und Tol2 Transposon Methode zur Identifikation von regulatorischen Elementen im Zebrafisch". Freie Universität Berlin
- Georgi, U., Herrmann O., Poustka, A. J., Vingron, M., Lehrach, H., Hufton, A. L., Panopoulou G. (2010). Evolution of function via the degeneration of binding motifs within the 3'UTR of the teleost Sonic hedgehog a (Shha). Poster presentation at the Max Planck Institute for Molecular Genetics Day of Science 2010. Berlin, Germany
- Grabher, C., & Wittbrodt, J. (2007). Meganuclease and transposon mediated transgenesis in medaka. *Genome Biology*, 8(Suppl 1), S10. BioMed Central Ltd. doi: 10.1186/gb-2007-8-S1-S10.
- Hadzhiev, Y., Lang, M., Ertzer, R., Meyer, A., Strähle, U., Müller, F.(2007). Functional diversification of sonic hedgehog paralog enhancers identified by phylogenomic reconstruction. *Genome biology*, 8(6), R106. doi: 10.1186/gb-2007-8-6-r106.

- Hermann, Oliver (2009) Bachelor Thesis: "Funktionelle Analyse der konservierten, nicht kodierenden Elemente des sonic hedgehog Gens in Fugu (*Takifugu rubripes*), Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) und Medaka (*Oryzias latipes*)". Fachhochschule Zittau/Görlitz
- Hinman, V. F., & Davidson, E. H. (2007). Evolutionary plasticity of developmental gene regulatory network architecture. *PNAS*, *104*(49), 1-6. doi: 10.1073/pnas.0709994104.
- Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J. S., & Meyer, A. (2004). Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *Journal of molecular evolution*, *59*(2), 190-203. doi: 10.1007/s00239-004-2613-z.
- Holland, L. Z., Albalat, R., Azumi, K., Benito-Gutiérrez, E., Blow, M. J., Bronner-Fraser, M., . . . , Holland, P. W. H. (2008). The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome research*, *18*(7), 1100-11. doi: 10.1101/gr.073676.107.
- Hufton, A. L., Mathia, S., Braun, H., Georgi, U., Lehrach, H., Vingron, M., . . . , Panopoulou, G. (2009). Deeply conserved chordate noncoding sequences preserve genome synteny but do not drive gene duplicate retention. *Genome research*, *19*(11), 2036-51. doi: 10.1101/gr.093237.109.
- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins†. *Journal of Molecular Biology*, *3*(3), 318-356. doi: 10.1016/S0022-2836(61)80072-7.
- Jones, S. J. (2006). Prediction of genomic functional elements. *Annual review of genomics and human genetics*, *7*, 315-38. doi: 10.1146/annurev.genom.7.080505.115745.
- Jurica, M., & Stoddard, B. (1999). Homing endonucleases: structure, function and evolution. *Cellular and molecular life sciences*, *55*(10), 1304–1326. Springer.
- Kelsh, R. N., Brand, M., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P., Lin, S., Haffter, P., . . . , Nüsslein-Volhard, C. (1996). Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. *Development (Cambridge, England)*, *123*, 369-89.
- Lin, S. (2000). "Transgenic zebrafish." *Methods Mol Biol* *136*: 375-83. perspectives." *Genome Biol* *8* Suppl 1: S1.
- Levine, M., & Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, *424*(6945), 147-51. doi: 10.1038/nature01763.
- Manke, T., Heinig, M., & Vingron, M. (2010). Quantifying the effect of sequence variation on regulatory interactions. *Human mutation*, *31*(4), 477-83. doi: 10.1002/humu.21209.
- Manke, T., Roider, H. G., & Vingron, M. (2008). Statistical modeling of transcription factor binding affinities predicts regulatory interactions. *PLoS computational biology*, *4*(3), e1000039. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000039.
- Martinez, N. J., & Walhout, A. J. (2009). The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks. *BioEssays*, 435-445. doi: 10.1002/bies.200800212.
- Mátés, L., Izsvák, Z., & Ivics, Z. (2007). Technology transfer from worms and flies to vertebrates: transposition-based genome manipulations and their future perspectives. *Genome biology*, *8* Suppl 1, S1. doi: 10.1186/gb-2007-8-s1-s1.

- Müller, F., Williams, D., Kobilák, J., Gauvry, L., Goldspink, G., Orbán, L., Maclean, N. (1997). Activator effect of coinjected enhancers on the muscle-specific expression of promoters in zebrafish embryos. *Molecular reproduction and development*, 47(4), 404–412. John Wiley & Sons. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199708)47:43.O.CO;2-O.
- Müller, F., Chang, B., Albert, S., Fischer, N., Tora, L., Strähle, U. (1999). Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehog in floor plate and notochord. *Development (Cambridge, England)*, 126(10), 2103-16.
- Naya, F. J., & Olson, E. (1999). MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6), 683-688.
- Nobrega, M. A., & Pennacchio, L. A. (2004). Comparative genomic analysis as a tool for biological discovery. *The Journal of physiology*, 554(Pt 1), 31-9. doi: 10.1113/jphysiol.2003.050948.
- Panopoulou, G., & Poustka, A. J. (2005). Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications -- the adventure of a hypothesis. *Trends in genetics : TIG*, 21(10), 559-67. doi: 10.1016/j.tig.2005.08.004.
- Parinov, S. & Emelyanov, A. (2007). "Transposable elements in fish functional genomics: technical challenges and perspectives." *Genome Biol* 8 Suppl 1: S6.
- Roider, H. G., Kanhere, A., Manke, T., & Vingron, M. (2007). Predicting transcription factor affinities to DNA from a biophysical model. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(2), 134-41. doi: 10.1093/bioinformatics/btl565.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc Nat Acad Sci USA* 74:5463-7.
- Ticho, B. S., Stainier, D. Y., Fishman, M. C., & Breitbart, R. E. (1996). Three zebrafish MEF2 genes delineate somitic and cardiac muscle development in wild-type and mutant embryos Zebrafish MEF2A Zebrafish MEF2C Zebrafish MEF2D. *Mechanisms of Development*, 59.
- Winkler, C., Vielkind, J., & Scharf, M. (1991). Transient expression of foreign DNA during embryonic and larval development of the medaka fish (*Oryzias latipes*). *Molecular and General Genetics MGG*, 226(1), 129–140. Springer.
- Woolfe, A., Goodson, M., Goode, D., Snell, P., McEwen, G., Vavouri, T., . . . , Elgar, G. (2005). Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. *PLoS Biol*, 3(1), e7.
- Zardoya, R., Abouheif, E., & Meyer, A. (1996). Evolution and orthology of hedgehog genes. *Trends in genetics : TIG*, 12(12), 496-7.

6 Anhang

6.1 DNA-Sequenzen

6.1.1 Konserviertes 913 bp Fragment aus dem 3'UTR aus dem *shh*-Gen der Maus (*Mus musculus*)

AAGTAGGGCAGTCCAAAGTAGACTATAAGGAAGCAAAAACCCCGGGGAGTTCTGTTGTTATG
TTTAGTTTATATATTTTTTTGAAATTTTTTCGTTATTGTCTTATATGGGTTGTTTTTCTCCTC
TCCTGGCTATTTATTTGTTTCGTATGAATAGATGTTTTAAAAATATGAACGGACCTTCAAGA
GCCTTAACTAGTTTGTGTCTTGGATAATTTATTATTGTGTGAACGTACTCACAGTGAGGGA
AAGATTATTTTGTGAGGCCAAGCAACCTGCTGAAAGTCTATTTTTCTACATGTCCCTTGTCC
TGCGTTTCAGAAGGCAAACCTCCGCATTCTCTCCTGCTATGCTCCTGCTTTCCCGCAAGTG
TAAACTAAAACCTGCTCCATGGGGTCCACAAATTATATTTTTTATACACAGAATTGTAAATT
AGATTTTTGAGAGATCAATACCTAACTGAATGACATTTTCATTTTTTGAAAGTGAAAATATG
AAAATATATTATTTTAAATTTAACTATTTTCCAATGTAATAGCCGTCTTCTGTACTGCCTTCT
TGTTTTGTATTTGCTTTGTAACCGCCACTTTGTTCATGTTCTTGGAAACCAAGACTGTTAACG
CACACATATACACTTTTTTTTTTTGACAGACTGGAAGAACTCTGTTATTTTTTAACTTCAAAGA
ATTTATTAGAAAATAATATTTTTTAAAAGTGCACCTAGCAGCGAGCCCACGAGGATGGAGCC
TGTAGTTTGTACAGAGAAAACAAGGATGTTTTTGCATTAATAAACTGAGAAGTAACTGCTG
TAAATTTACTAAAATGTATTTTTGAATATTTTGTAAATAGTTTTATAGAAAATAAAGCGTGCCA
CACACACCCAGTGGTCAGTAGATATTTTCTGAGAATTCCTGTTGC

6.1.2 Konserviertes 1098 bp Fragment aus dem 3'UTR aus dem *shh*-Gen vom Huhn (*Gallus gallus*)

AAGTAGGACAGTCCAAAGTAGACTTTAAGGGAAACAAGACCCCGGGAAGTTCTGTTCCGTT
TAGTTTATAAATATATATATATATTTTTTATTTGTTCTTTTTGTTGTTTTGTTTATTGTTG
TTGTTGTTGTTGGTTTTATTTTTTCCCTCCTCCTGGATATTTATTTCTTTGGTACGTCGAA
TAGATGTTTTAAATGATATGAACCGGACCTTCAAGAGCCTTAAATAGTTTCTTTGGTAATTT
ATTATCATGCGAACTGTTCTCACAGGGGAAAAAATTATTTTGTGAGGCCGAGCAAAACTGCG
CAGAGTCTATTTTTCTACATGTTCATGTGTGTCTGACTTTCAGAAAGCAAAATTCGGTACCT
TCCCATCTCTCATTACGCTGCTCCTTTCATTTTCAGCGAGTCTAGAGGAACAAGCAAGCGAAC
AAACATACAGAAAAGAAAGACAACTTCATGGGGTCCGTAAATTATATTTTTTATACACAGA
ATTGTAATTAGATTTTTTTGAGAGATCAATACTTAACTGAATCACATTTTCGTTTTTTGAAA
TAGTGTAATAACGAGAATATATTTTAAATTTAAATAGCTCCAAATGTAACGTCATTTCC
TGTATTGTTTTCCATGTCTCTTAAATATTTTTGCTCTGTAAAAAAGAAAACAC
CACCACCATTTGGCCACGTTTCATGGAAGTCAAGACTGTTACACAACTCTTTATTTGCAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAGAAAGAAAGAAAGAGAGAAAAGAAAGAAAGAAATG
AAAGAAAGAAAAGCCGTAAGAACTTTGTTATTTTTTAACTGCAAGAAAAAATAATTATTAG
AAAATAATATTTTTTAAAGAAGCGCACATGGCGCGATTCTGTGACGATGGAGGCGGTAGTTT
GTACAGAGGGGAGAAAAGGATGTTTTGCATTAATAAATTGAGAAATAACTGCTGTAAATTTA
CTAAAATGTATTTTTGAATATTTTGTAAATAGTTTTAATAGTTTTATAGAAAATAAATGTGCC
ATGCACAGTCTGGTTAGTATATAATAACTAAGAGTTTCTGTTGC